

CLARICE SCLiar SASSON

**INFLUÊNCIA DOS VEÍCULOS COSMÉTICOS NA PERMEAÇÃO  
CUTÂNEA DA ASSOCIAÇÃO DE FILTROS SOLARES E ACETATO  
DE TOCOFEROL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Insumos, medicamentos e correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Profª. Dra. Mayumi Eliza Otsuka Sato

CURITIBA

2006

CLARICE SCLIAR SASSON

**INFLUÊNCIA DOS VEÍCULOS COSMÉTICOS NA PERMEAÇÃO  
CUTÂNEA DA ASSOCIAÇÃO DE FILTROS SOLARES E ACETATO  
DE TOCOFEROL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Insumos, medicamentos e correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mayumi Eliza Otsuka Sato

CURITIBA

2006

## **DEDICATÓRIA**

... Aos meus pais,  
que foram o alicerce para a  
construção dos meus sonhos, me dando muito amor e força.

... Ao meu marido,  
pelo carinho, amor, apoio e, acima de tudo, por me ensinar  
a ter segurança, confiança e perseverança.

... Aos meus irmãos,  
pelo amor e a força que nos une

## **AGRADECIMENTOS**

... Ao Boticário, mas especialmente ao Israel H. Feferman e ao Richard A. S. Schwarzer, pelo apoio, incentivo, amizade e colaboração concedidos para que eu pudesse realizar este trabalho.

... Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por esta oportunidade.

... À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayumi E.O.Sato, pela orientação, apoio, interesse e amizade.

... À amiga Ângela Dakiw Piaciski, pela grande ajuda, apoio e atenção que me deu nos estudos de permeação cutânea, mas acima de tudo pela amizade e paciência.

... Aos grandes amigos, Klézia M. S. Beletti e Fabrício Cunha Mota por todo o apoio, ajuda, atenção e colaboração que me deram nas análises de CLAE, mas acima de tudo, agradeço pela amizade e paciência.

... Às amigas, Gisela, Odivânia e Marina, que me ajudaram muito na realização deste trabalho.

... Às minhas amigas e companheiras de trabalho, Danielle, Mirian, Leila e ao meu amigo Rodrigo, pelo incentivo, apoio e compreensão das minhas ausências, atribulações e nervosismos.

... A todos os meus amigos do trabalho que em todos os momentos foram prestativos, voluntários, compreensivos mais acima de tudo, companheiros.

... Ao Plínio, pela grande ajuda que me deu nas análises estatísticas.

... Aos meus irmãos, pelo carinho e incentivo.

... Ao meu marido, que me apoiou, incentivou e em todos os momentos esteve ao meu lado para tudo que fosse preciso.

... Aos meus pais, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

... À Deus, que me deu a vida, saúde e força nos momentos mais difíceis.

## SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas e siglas .....</b>	<b>V</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>X</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
2.1 A RADIAÇÃO UV E A PELE .....	5
2.2. FILTROS SOLARES .....	6
2.3. A VITAMINA E COMO ANTIOXIDANTE .....	9
2.4. A INFLUÊNCIA DA FORMULAÇÃO NA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS FILTROS SOLARES E DO ACETATO DE TOCOFEROL.....	13
2.5. TIPOS DE VEÍCULOS.....	15
2.6. TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA .....	16
<b>3. OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
4.1. MATERIAIS .....	22
4.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas .....	22

4.1.2. Equipamentos e acessórios .....	24
4.2. MÉTODOS .....	26
4.2.1. Processo de fabricação dos veículos .....	26
4.2.2. Estabilidade dos veículos .....	27
4.2.3. Determinação das características organolépticas e físicas dos veículos. ....	27
4.2.4. Caracterização físico-química do octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano, 4-metilbenzilideno cânfora e do acetato de tocoferol. ....	27
4.2.4.1. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água.....	28
4.2.4.2. Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo .....	29
4.2.4.3. Solubilidade do octocrileno, 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e acetato de tocoferol para determinação da solução receptora. ....	29
4.2.5. Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	30
4.2.5.1. Empregando os ativos incorporados nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.....	31
4.2.6. Estudos de retenção cutânea <i>in vitro</i> dos ativos incorporados nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico. ....	32
4.2.6.1. Retenção no estrato córneo- <i>tape stripping</i> .....	32
4.2.6.2. Retenção na [epiderme sem estrato córneo +derme] .....	32
4.2.7. Estudo de permeação cutânea <i>in vivo</i> .....	33
4.2.7.1. Verificação da integridade dérmica por avaliação da perda de água transepidermal.....	33
4.2.7.2. Estudo de permeação cutânea <i>in vivo</i> por técnica de <i>tape stripping</i> .....	33
4.2.8. Padronização do método para análise do octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano e 4-metilbenzilideno cânfora por CLAE .....	34
4.2.9. Padronização do método para análise do acetato de tocoferol por CLAE. ....	35
4.2.10. Validação dos métodos de doseamento dos ativos .....	35
4.2.11. Análise estatística dos dados .....	35
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>

5.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E FÍSICAS DOS VEÍCULOS. ....	37
5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO OCTOCRILENO, BUTIL METOXIDIBENZOILMETANO, 4-METILBENZILIDENO CÂNFORA E DO ACETATO DE TOCOFEROL. ....	38
5.2.1. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água.....	38
5.2.2. Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo .....	40
5.2.3. Solubilidade do octocrileno, 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e acetato de tocoferol para determinação da solução receptora. ....	40
5.3. ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> .....	41
5.3.1. Empregando os ativos incorporados no gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico. ....	41
5.4. ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VIVO</i> .....	54
5.4.1. Avaliação da perda de água transepidermal. ....	54
5.4.2. Permeação cutânea <i>in vivo</i> por técnica de <i>tape stripping</i> empregando os ativos incorporados no gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.....	54
5.5. CURVAS DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS ATIVOS: 4-METILBENZILIDENO CÂNFORA, BUTIL METOXIDIBENZOILMETANO E OCTOCRILENO .....	60
5.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DO ATIVO: ACETATO DE TOCOFEROL .....	64
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcT-	Acetato de tocoferol
BMDM-	Butil metoxidibenzoilmetano
CLAE-	Cromatografia líquida de alta eficiência
EC-	Etrato córneo
FDA-	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS-	Fator de proteção solar
4-MC	4-metilbenzilideno cânfora
O/A-	Óleo em água
OC-	Octocrileno
OECD-	<i>Organization for Economic Co-Operation and Development</i>
P.A.-	Para análise
P <sub>o/a</sub> -	Partição óleo/água
P <sub>ec/veículo</sub> -	Partição estrato córneo/veículo
Q.S.P-	Quantidade suficiente para
SR-	Solução receptora
UVA-	Ultravioleta A
UVB-	Ultravioleta B



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAR O LOG P DA 4-MC.....	38
TABELA 2. VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAR O LOG P DO BMDM. ....	39
TABELA 3. VALORES COMPARATIVOS DE LOG P OBTIDOS POR CÁLCULOS MATEMÁTICOS E POR CLAE.....	40
TABELA 4. QUANTIDADE DE ATIVO NÃO PARTILHADO NO EC.....	40
TABELA 5. VALORES COMPARATIVOS DA SOLUBILIDADE DOS ATIVOS NA SR E EM ISOPROPANOL OBTIDOS POR CLAE. ....	41
TABELA 6. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO .....	41
TABELA 7. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) .....	42
TABELA 8. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (%).....	42
TABELA 9. ATIVOS RETIDOS SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA . ....	44
TABELA 10. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A . ....	44
TABELA 11. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).....	45
TABELA 12. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A ( % ).....	46
TABELA 13. ATIVOS RETIDOS SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA .....	47
TABELA 14. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO .....	48
TABELA 15. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).....	48
TABELA 16. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO (%)...48	
TABELA 17. ATIVOS RETIDOS SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA .....	50
TABELA 18. VALORES COMPARATIVOS DO AcT RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.....	53
TABELA 19. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DA 4-MC RETIDA SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO .....	53

TABELA 20. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DO BMDM RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO .....	53
TABELA 21. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DO OC RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO .....	53
TABELA 22. VALORES OBTIDOS DA MEDIDA DE PERDA TRANSEPIDERMAL DE ÁGUA POR VAPORIMETRIA .....	54
TABELA 23. AcT NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS E 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	54
TABELA 24. AcT RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA .....	55
TABELA 25. 4-MC NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS E 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	56
TABELA 26. 4-MC RETIDA SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA .....	57
TABELA 27. BMDM NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS EM 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	57
TABELA 28. BMDM RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA.....	58
TABELA 29. OC NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS EM 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	59
TABELA 30. OC RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA .....	60

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CÉLULA DE DIFUSÃO EMPREGADA NOS ESTUDOS DE PERMEACÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> .....	30
FIGURA 2. VALORES DE LOG P EM FUNÇÃO DE LOG K PARA DETERMINAR O COEFICIENTE DE PARTILHA DA 4-MC. ....	38
FIGURA 3- VALORES DE LOG P EM FUNÇÃO DE LOG K PARA DETERMINAR O COEFICIENTE DE PARTILHA DO BMDM.....	39
FIGURA 4- PERMEACÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO.....	42
FIGURA 5 - RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). ....	43
FIGURA 6- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (%).....	43
FIGURA 7- PERMEACÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A .....	45
FIGURA 8-.RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).....	46
FIGURA 9- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A (%).....	47
FIGURA 10- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).....	49
FIGURA 11- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO (%).....	49
FIGURA 12- PERMEACÃO CUTÂNEA DA 4-MC NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.....	50
FIGURA 13- RETENÇÃO CUTÂNEA DA 4-MC NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO .....	51
FIGURA 14- RETENÇÃO CUTÂNEA DO BMDM NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO .....	51
FIGURA 15-.RETENÇÃO CUTÂNEA DO OC NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	52
FIGURA 16- RETENÇÃO CUTÂNEA DO AcT NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO. ....	52
FIGURA 17- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO Córneo DO AcT EM 30' E 4h. ....	55

FIGURA 18-RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DA 4-MC EM 30' E 4h. ....	56
FIGURA 19- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DO BMDM EM 30' E 4h. ....	58
FIGURA 20- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DO OC EM 30' E 4h .....	59
FIGURA 21-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO 4-MC POR CLAE .....	60
FIGURA 22-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO BMDM POR CLAE .....	61
FIGURA 23- REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO OC POR CLAE .....	61
FIGURA 24-CROMATOGRAMA ILUSTRANDO A ANÁLISE DO 4-MC, OC E BMDM .....	62
FIGURA 25- CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NO GEL ALCOÓLICO .....	63
FIGURA 26- CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NA EMULSÃO O/A.....	63
FIGURA 27- CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NO FLUIDO ALCOÓLICO .....	64
FIGURA 28-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO AcT POR CLAE .....	64
FIGURA 29- CROMATOGRAMA ILUSTRANDO A ANÁLISE DO AcT. ....	65
FIGURA 30-CROMATOGRAMA REFERENTE AO AcT NO GEL ALCOÓLICO.....	66
FIGURA 31 CROMATOGRAMA REFERENTE AO ACETATO DE TOCOFEROL NA EMULSÃO O/A.....	66
FIGURA 32- CROMATOGRAMA REFERENTE AO ACETATO DE TOCOFEROL NO FLUIDO ALCOÓLICO. ....	67

## RESUMO

Devido à exposição excessiva a radiação UV e a crescente incidência de cânceres de pele, há uma grande preocupação em desenvolver protetores solares cada vez mais eficazes e que devem conter em sua formulação uma combinação de filtros solares que absorvam a radiação UVA e UVB, associados à substâncias antioxidantes como o acetato de tocoferol. Para uma ação eficaz, os filtros solares devem permanecer sobre a superfície cutânea e nas camadas superiores do estrato córneo e o acetato de tocoferol deve ficar retido nas camadas mais profundas da pele, onde ocorrem as reações oxidativas. O presente trabalho teve por objetivo verificar a influência dos veículos cosméticos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico, na permeação e retenção cutânea do acetato de tocoferol associado aos filtros solares: 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e octocrileno. Determinou-se previamente os coeficientes de partilha o/a e ec/veículo, bem como a solubilidade dos mesmos na solução receptora. Os experimentos de permeação cutânea *in vitro*, foram realizados em células de difusão e os experimentos *in vivo*, por técnica de *tape stripping*. Os ativos foram doseados por CLAE e submetido à análise estatística por ANOVA seguido de *post-hoc* de Tukey. No experimento *in vitro*, a emulsão o/a, apresentou ser o veículo mais indicado para este tipo de associação, pois possibilitou a retenção dos filtros solares sob a superfície cutânea e estrato córneo e a retenção do acetato de tocoferol em grande concentração na epiderme viável e derme. O experimento *in vivo*, demonstrou que inicialmente, os filtros solares e o acetato de tocoferol estavam retidos sob a superfície cutânea e estrato córneo, e com o passar do tempo, a quantidade dos ativos retidos diminuiu consideravelmente, principalmente com o veículo gel alcoólico. Confirmando os resultados obtidos *in vitro*, o ensaio *in vivo*, demonstrou que a emulsão o/a pode ser considerada a mais adequada para esta associação pois grande parte dos filtros solares ficaram sob a superfície cutânea e estrato córneo e a quantidade de acetato de tocoferol encontrada no estrato córneo ao longo do tempo, foi decrescendo, indicando que o mesmo pode ter passado para a epiderme viável, derme e circulação sanguínea. O teste *in vitro* foi adequado para dar um direcionamento, que posteriormente foi confirmado pelos testes *in vivo*.

## ABSTRACT

Due to the excessive exposure to the UV radiation and the rise of skin cancers, there has been growing concern over the development of more and more efficient sunscreens which must have in its formulation a combination of sunscreens that are able not only to absorb the UVA and UVB radiation but also be associated to antioxidant actives, like the tocopheryl acetate. For an efficient action of the sunscreen agents, they should remain on the skin or in the upper layers of the stratum corneum and the tocopheryl acetate should be retained in the deeper layers of the skin, where the greatest oxidative reactions occur. The present work aimed to observe the influence of different vehicles, such as alcoholic gel, an emulsion o/w and alcoholic fluid, in the cutaneous permeation and retention of the tocopheryl acetate associated with the sunscreens: 4-methylbenzylidene camphor, butyl methoxydibenzoylmethane and octocrylene. Primarily, it was determined the partition coefficient o/w and sc/vehicle as well as their solubility in the receptor solution. The experiments of cutaneous permeation *in vitro*, were realized in diffusion cells and the *in vivo* experiments, with *tape stripping* technique. The actives were measured by HPLC and the results were statistic analyzed by ANOVA followed by *post-hoc* from Tukey. In the *in vitro* experiment, the o/w emulsion was considered the best for this kind of association, once there was retention of most of the sunscreens in the cutaneous surface and in the stratum corneum. Also, it enabled the retention of the tocopheryl acetate in quantity in viable epiderm and derm. The *in vivo* experiment, showed that in the beginning most part of the sunscreens and the tocopheryl acetate were retained up the cutaneous superficial and stratum corneum but passing the time, it was observed that the quantity of the actives considerable decreased, mainly when was used the alcoholic gel. Confirming the results previously obtained by the *in vitro* experiment, the *in vivo* experiment showed that the emulsion o/w can be considered the best vehicle for this kind of association, because most part of the sunscreens stayed up the cutaneous superficial and stratum corneum and the quantity of the tocopheryl acetate founded in the stratum corneum, passing the time, was decreasing, what can be an indicative that it could have passed to the viable epiderm, derm and blood vessels. The *in vitro* test was good to give a direction, followed confirmed by the *in vivo* test.



## **1. INTRODUÇÃO**

Atualmente, tem-se o conhecimento de que embora a exposição à radiação ultravioleta promova alguns efeitos benéficos como: aquecimento corpóreo; síntese de vitamina D, que promove a retenção de cálcio nos ossos; ação antidepressiva e efeito fotoprotetor; que em doses moderadas estimula a síntese de melanina, a exposição à radiação ultravioleta também provoca inúmeros efeitos danosos como: queimaduras, fotoenvelhecimento e cânceres de pele. Portanto, a aplicação de protetores solares se torna necessária como um meio de proteger a pele contra os seus efeitos nocivos.

Com isto, existe a necessidade de protetores solares extremamente eficazes, que possam garantir grande segurança aos usuários. Mas o que se pode definir como um protetor solar eficaz?

De uma maneira generalista, um protetor solar ideal, deve conter em sua formulação, filtros solares com ampla capacidade de absorção da radiação UVB, responsável pela formação de eritemas e à longo prazo câncer de pele; filtros solares com capacidade de absorção da radiação UVA, responsável pelo fotoenvelhecimento, formação de radicais livres e câncer de pele. O sistema de filtros solares em uma formulação deve ser preferencialmente fotoestável.

Um produto para proteção solar deve conter polímeros ou resinas que proporcionem resistência à água e ainda, é importante que a formulação contenha agentes antioxidantes, como a vitamina E, usualmente utilizada na forma de acetato, por ser mais estável, com a função de combater a ação dos radicais livres sobre os lipídios de membrana celular, interrompendo as reações em cadeia e auxiliando na prevenção do câncer de pele. Hoje, é comum e salutar realizar esta associação nas formulações com o objetivo de cumprir os requisitos citados acima, garantindo uma maior segurança ao consumidor.

Levando-se em consideração que o acetato de tocoferol e a maioria dos filtros solares são lipofílicos e se encontram na fase oleosa das formulações, tem-se um impasse a ser resolvido: os filtros solares, para exercerem sua ação devem absorver a radiação ultravioleta e permanecerem na superfície ou nas camadas superiores do estrato córneo. Uma vez absorvidos, os mesmos ficam impossibilitados de exercerem sua ação, além de potencializarem possíveis reações alérgicas. Ao contrário, as substâncias com ação antioxidante, como o acetato de tocoferol, para



exercer sua ação anti-radicalar, deve ser hidrolisado a tocoferol livre e permear até a epiderme viável e derme, onde ocorrem as maiores reações oxidativas ocasionadas pela radiação UV.

Vários fatores influenciam na permeação cutânea de um ativo, como tempo de aplicação, dose aplicada, veículo utilizado; local anatômico envolvido entre outros. Atualmente, a preocupação com o estudo da permeação cutânea de filtros solares é uma realidade e vários trabalhos publicados demonstram isto.

Por outro lado, pouco se tem estudado sobre a permeação cutânea de filtros solares associados a outras substâncias, como o acetato de tocoferol, onde existe a necessidade da permeação de um ativo e ao mesmo tempo, a necessidade de que o outro permaneça na superfície cutânea.

Considerando o exposto, a estratégia do trabalho basear-se-á no estudo da influência de diferentes veículos, sendo eles, gel alcoólico, emulsão não iônica o/a e fluido alcoólico, na permeação e retenção cutânea dos filtros solares 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e octocrileno associados ao acetato de tocoferol. A hipótese de trabalho considera a possibilidade de obtenção de veículos cosméticos, que possibilitem a manutenção dos filtros solares sob a superfície cutânea ou sob as camadas superiores do estrato córneo e que, permita a permeação do acetato de tocoferol até a epiderme viável e derme.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A RADIAÇÃO UV E A PELE

Por anos, a exposição à luz solar foi vista como benéfica para o bem estar, tanto emocional como físico (NESS *et al.*, 1999).

Em certos aspectos, a exposição solar pode ser benéfica, como por exemplo, a síntese de vitamina D. Entretanto, pode acarretar sérias conseqüências na pele, como fotoenvelhecimento cutâneo e cânceres de pele de diferentes tipos, de acordo com a proporção e o comprimento de exposição (PATEL *et al.*, 1992; HORRIOT *et al.*, 1995; BERSET *et al.*, 1996; VANQUERP *et al.*, 1999). Deste modo, é importante o uso de filtros solares para proteção dos efeitos danosos dos raios UV (BERARDESCA *et al.*, 1991; COLE e VAN FOSSEM, 1992; SAYRE *et al.*, 1992; LOTTE *et al.*, 1993).

Pesquisas têm mostrado que a radiação UV danifica o DNA e o material genético, oxida os lipídios e produz perigosos radicais livres, causa inflamação, rompe a comunicação celular, modifica a expressão dos genes em resposta ao estresse e enfraquece a resposta imune da pele. (RANGARAJAN e ZATZ, 2003). Além disso, aumenta o risco de câncer cutâneo, promove o fotoenvelhecimento e exacerba dermatoses foto sensíveis (TAYLOR e COL, 1990; WOLF *et al.*, 1993). Está claramente estabelecido que os comprimentos de onda ultravioleta da luz solar contribuem na formação destas malignidades na pele, principalmente em melanócitos, células escamosas e basais. Mas o comprimento de onda preciso e os mecanismo de ação envolvido não estão devidamente elucidados.

Por características do próprio trabalho ou pelos padrões estéticos, que valorizam o bronzeado, as pessoas continuam se expondo constantemente à radiação UV. Assim, torna-se fundamental a proteção contra os seus efeitos prejudiciais (BILLHIMER, 1989).

O espectro eletromagnético da radiação solar compreende desde os curtos raios cósmicos, até as longas ondas de rádio. A radiação não ionizante compreende a ultravioleta (UV), com comprimento de onda entre 100 e 400 nm, a luz visível, de 400 a 800 nm, e a infravermelha, de 800 a 1700 nm. A radiação ultravioleta é a principal responsável pelos fotodanos cutâneos, e são divididas em três categorias: UVC (100-290nm), UVB (290-320nm) e UVA (320-400nm) (EPSTEIN, 1990).

Os raios UVC não atingem a superfície da Terra em quantidade significativa, pois são filtrados na camada de ozônio, portanto, ainda não constituem risco para a população. Com a diminuição progressiva desta camada, entretanto, esta radiação pode tornar-se perigosa (KOH e LEW, 1994).

Os raios UVB (280-320nm) ultrapassam a camada de ozônio, atingem a pele, penetrando até a camada basal da epiderme e, através de um efeito direto, causam eritema, imunossupressão, inibição da síntese de DNA, RNA, alterações da síntese de proteínas, lise das membranas celulares e mutação celular, nos casos de carcinomas de células basais e escamosas. Estes raios são parcialmente bloqueados pela camada de ozônio, e a diminuição de 1% desta, provoca o aumento de 2% da radiação UVB na superfície do planeta, o que gera uma elevação potencial da incidência de câncer de pele. Já os comprimentos de onda da radiação UVA (320-400nm) interagem indiretamente, em nível de derme reticular, induzindo a produção de radicais livres que podem causar envelhecimento precoce ou fotoenvelhecimento e indução tumoral (MATSUI e DELEO, 1991; KOH e LEW, 1994; PACKER, 1994; LINGE, 1996; SCHARFETTNER-KOCHANNEK *et al.*, 1997).

Além disso, a radiação UVA induz a produção da p53 e danos ao DNA (BURREN *et al.*, 1998), imunossupressão (DUMAY *et al.*, 2001) e instabilidade genômica (PHILIPSON *et al.*, 2002). Informações epidemiológicas associam o melanoma à exposição intensa a luz solar na infância e principalmente, ocasionado pela exposição à radiação UVA (MOAN *et al.*, 1999).

Apesar de serem menos carcinogênicos do que os UVB, proporcionalmente os raios UVA atingem de 10 a 100 vezes mais a superfície da Terra (HERBERT, 1983).

## 2.2 FILTROS SOLARES

A proteção efetiva contra os raios ultravioleta pode ser encontrada em formulações químicas para aplicação tópica, conhecidas como filtros solares.

O primeiro relato de utilização de um filtro solar no mundo foi em 1928, nos EUA. A disseminação do uso de fotoprotetores deu-se principalmente nas últimas duas décadas, após a classificação destes como droga pelo FDA (*Food and Drug Administration*), e pelo aumento da conscientização da população dos riscos da exposição solar, através de campanhas educativas e mídia (SHAATH, 1990). Desde

então, o uso de protetores solares, a descoberta e produção de substâncias capazes de proteger o homem dos perigos da radiação solar tem sido de interesse principal. Hoje, uma ampla faixa de filtros, absorvedores de luz ultravioleta estão disponíveis para formulações de protetores solares (TREFFEL e GABARD, 1996) e a ênfase é a combinação de filtros UVA e UVB para maior eficácia e segurança.

Os ativos utilizados em protetores solares são geralmente classificados como filtros físicos e químicos. Físicos compreendem partículas que atuam por difusão, refletindo a passagem de radiação. Químicos atuam absorvendo a radiação UV incidente, e então as dissipam com uma energia de comprimento de onda maior e desta maneira, protegem a pele dos danos potenciais da radiação UV. A eficácia dos protetores solares contra as radiações UVA e UVB têm permitido o desenvolvimento de preparações solares contendo combinações diferenciadas de filtros químicos (SARVEIJA *et al.*, 2004).

A eficácia de uma formulação de filtro solar é comumente determinada *in vivo* por meio da maior ou menor proteção proporcionada contra a queimadura solar (eritema). A técnica mais amplamente utilizada envolve a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). Este índice é definido como a razão entre a quantidade de energia necessária para produzir um grau de eritema mínimo na pele protegida com o filtro solar sobre a quantidade de energia que leva ao mesmo grau de eritema na pele não protegida (PATHAK, 1983).

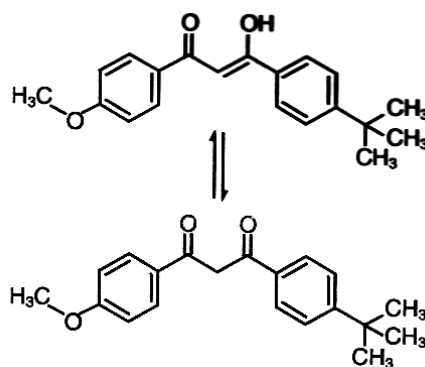
Filtros UV não somente protegem contra a queimadura solar, mas também, à longo prazo, contra danos crônicos a pele, incluindo danos ao DNA celular, supressão imune fotoinduzida e em extensão, câncer de pele (NOHYNEK, 2001). Diminuem também a imunossupressão causada pela radiação UVB (MORISON, 1984).

Mesmo com o extensivo uso de filtros solares, nas duas últimas décadas, a incidência de cânceres de pele vem aumentando, mas por outro lado, dados têm mostrado que o uso dos mesmos diminui a formação de ceratoses actínicas, as quais estão ligadas a carcinomas de células escamosas (THOMPSON *et al.*, 1993; NAYLOR *et al.*, 1995). Modelos animais têm mostrado que os filtros solares reduzem a incidência de células tumorais escamosas e basais (SEKURA SNYDER e MAY, 1975; KLIGMAN *et al.*, 1980; FORBES *et al.*, 1989; REEVE *et al.*, 1990), causadas pela radiação UVB; entretanto, há muitos estudos sugerindo que o uso de filtros solares pode aumentar a incidência de melanoma (AUTIER *et al.*, 1995; AZIZI, 2000;

VAINIO e BIANCHINI, 2000). Isto pode se dar, devido à aplicação inadequada destes (STOKES e DIFFEY, 1997; WULF *et al.*, 1997) ou pela perda da durabilidade da aplicação ou a ineficácia dos filtros UVA em preparações de filtros solares, combinado a prolongados banhos de sol. (AUTIER *et al.*, 1995); ou ainda, a fotoinstabilidade de filtros solares que resultam em uma proteção reduzida.

A proteção da pele por fotoprotetores contra a exposição à radiação UVA depende não somente das características de absorção do produto, mas segundo DIFFEY, (2001) vários outros fatores estão envolvidos, como a quantidade de produto aplicado e a aplicação uniforme. Assim, a introdução de um seguro e efetivo filtro UVA, como o butil metoxidibenzoilmetano, permite aos pesquisadores ampliar a faixa de proteção UV. Reações fototóxicas na pele mediadas por fotossensibilizantes fracos podem ser reduzidas ou inibidas pela presença de absorvedores UVA (BERSET *et al.*, 1996).

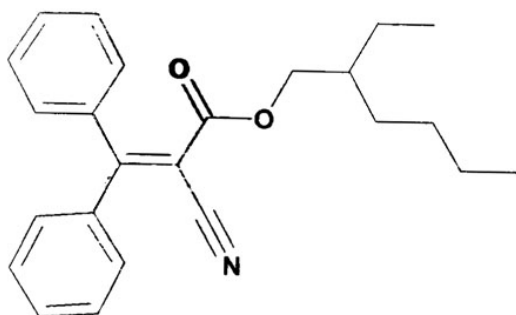
O butil metoxidibenzoilmetano (I), um derivado dibenzoilmetano, é um dos filtros orgânicos UVA mais usados no mundo. Sendo que numerosos produtos para à proteção solar e cuidados para a pele o contém, isolado ou combinado a outros filtros solares (BONDA, 1997).



(I) Estrutura química do butil metoxidibenzoilmetano

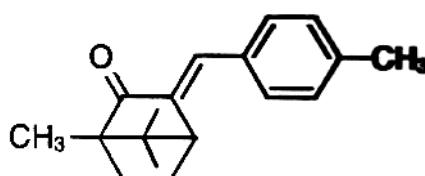
Infelizmente, a absorção da radiação UVA do butil metoxidibenzoilmetano tende a diminuir com o aumento da exposição à luz solar. Pesquisadores identificaram duas razões para esta tendência. A primeira é a fotólise onde a radiação UV catalisa a fragmentação da molécula, primeiramente no metano central. A segunda explanação pela perda de absorção é a conversão induzida pelo UV do enol ao tautômero ceto. A combinação do butil metoxidibenzoilmetano com o octocrileno, um filtro UVB, merece uma menção especial. O octocrileno (II), com uma energia na forma de triplete é um efetivo estabilizador para o butil

metoxidibenzoilmetano, e a combinação dos dois compostos é fotoestável (BONDA, 1997).



(II) Estrutura química do octocrileno

Um outro filtro UVB efetivo é a 4-metilbenzilideno cânfora (III). Um aspecto vantajoso particular deste filtro é seu efeito estabilizador de outro absorvedor UV, como o butil metoxidibenzoilmetano. Tem alta absortividade sendo compatível para uso nos principais tipos de produtos para proteção solar, além de proteger dos efeitos imunossupressores da radiação UVB (JACOBI *et al.*, 2004).



(III) Estrutura química da 4-metilbenzilideno cânfora

### 2.3. A VITAMINA E COMO ANTIOXIDANTE

A pele é um tecido altamente metabólico e possui a maior área de superfície do corpo humano, sendo a principal candidata e alvo aos danos dos radicais livres. É também sabido que os radicais livres estão envolvidos em mecanismos de danos cutâneos, como o envelhecimento precoce, desordens inflamatórias e cânceres de pele. Elaborados e diversificados mecanismos antioxidantes, tanto de natureza enzimática como não enzimática, protegem a pele dos danos oxidativos. Na última década, os antioxidantes têm sido propostos como ingredientes funcionais para prevenir e modular danos oxidativos na pele (VERTUANI *et al.*, 2003).

Mais de 20% da radiação UVB incidida na pele atinge as células viáveis da epiderme e aproximadamente 10% penetram na derme (EPSTEIN, 1990), bem como, alta proporção da radiação UVA e luz visível podem atingir a derme. A interação da luz UV com vários componentes da pele, resulta na formação de radicais livres.

Além de filtros solares em uma formulação, antioxidantes contribuem para a proteção solar, pois a pele, naturalmente já os utiliza para sua auto proteção contra os efeitos danosos da radiação solar (FUCHS, 1998).

RANGARAJAN e ZATZ (2003) citam a combinação de antioxidantes tópicos com filtros solares comuns para alcançar uma proteção superior contra os danos fotoinduzidos e relataram também que as formulações tópicas podem influenciar profundamente na penetração de antioxidantes na pele.

É bem apreciado e endossado que um efetivo protetor solar deva incluir antioxidantes. Pouca informação, entretanto, está disponível na argumentação da atividade de cada filtro solar na presença destes, e vice-versa.

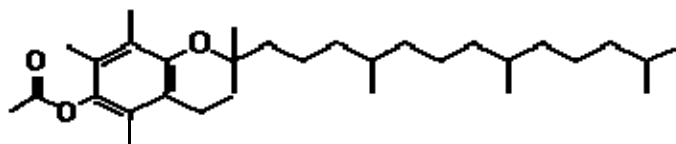
DARR *et al.* (1996) estudaram a combinação de dois antioxidantes, as vitaminas C e E, com um filtro solar comercial UV (oxibenzona) e encontraram uma proteção maior contra os danos fototóxicos. Estes resultados enfatizam a importância da combinação destes com filtros solares comuns, para maximizar a fotoproteção.

ALBERT *et al.* (1996) relataram que aproximadamente 62% das formulações de proteção solar contêm alguma forma de  $\alpha$ -tocoferol.

O papel crítico do  $\alpha$ -tocoferol para a proteção antioxidante da bicamada lipídica do estrato córneo e proteção contra a oxidação de proteínas do estrato córneo, tem sido recentemente revisado (THIELLE, 2001).

A indústria cosmética tem utilizado a vitamina E como antioxidante em filtros solares. O acetato de  $\alpha$ -tocoferol (IV) é mais frequentemente utilizado, por ser este, na forma de éster, mais estável a oxidação do que o tocoferol livre. Entretanto, a forma éster, necessita penetrar na epiderme viável e ser hidrolisado a tocoferol livre. O acetato de tocoferol tem sido utilizado como um captador de oxigênio gerado pela radiação UV (GASPAR e CAMPOS, 2002).





(IV) Estrutura química do  $\alpha$ - acetato de tocoferol

Após estudo, foi demonstrado que o acetato de tocoferol aplicado topicamente não apenas foi bem absorvido, mas também foi transportado lateralmente na pele, depois da absorção. Seguido isto, 4,5 a 5 %, foi hidrolisado na pele dentro de 24h. Isto indica que a pele tem estearases que realizam esta hidrólise, a qual ocorre provavelmente intracelularmente (TREVITHICK e MITTON, 1993).

NORKUS *et al.* (1993), demonstraram que o antioxidante efetivo na forma de dl- $\alpha$ -tocoferol é prontamente liberado, por hidrólise enzimática da forma acetato. A bioconversão é mostrada em um período de 10 dias, sendo que a mesma pode aumentar em torno de 70% pela influência da radiação UVB.

Aplicação tópica de  $\alpha$ -tocoferol tem demonstrado proteger contra os danos cutâneos induzidos por UV, como a atividade carcinogênica e mutagênica da radiação ionizante e de agentes químicos (ARNES, 1983). Segundo, GENSLER *et al.* (1996), o  $\alpha$ -tocoferol, reduziu a incidência de tumor em ratos e diminuiu as linhas de expressão, rugas e sardas induzidas pelo fotoenvelhecimento.

Segundo GASPAR e CAMPOS (2003), o acetato de tocoferol protegeu a pele de ratos da formação de células danificadas pelo sol. Conseqüentemente, este pode aumentar o efeito protetor dos filtros solares contra a formação de células fotodanificadas, as quais somente podem ser vistas por uma análise de histopatologia tradicional, notificada como um método não invasivo.

O  $\alpha$ -tocoferol é hoje considerado essencial para a estabilização das membranas biológicas, particularmente aquelas contendo grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados. A oxidação de gorduras insaturadas causa a peroxidação lipídica que interfere na estrutura e função das membranas biológicas. Quando o  $\alpha$ -tocoferol foi adicionado comercialmente em um creme na concentração de 0,1% a 1%, nenhum aumento na peroxidação lipídica foi observado durante 96 horas de exposição a luz solar (FURUSE, 1987).

HENEGOUWEN *et al.*(1992), usaram 0,25% de  $\alpha$ -tocoferol para avaliar a atividade de proteção UV *in vivo* em ratos. O  $\alpha$ -tocoferol em concentrações de 0,05%-2% foi usado como antioxidante em preparações tópicas. Em altas concentrações (2-10%) o  $\alpha$ -tocoferol pareceu promover benefícios na hidratação do estrato córneo (IDSON, 1978; GEHRING *et al.*, 1998). O  $\alpha$ -tocoferol puro e em preparações de  $\alpha$ -tocoferol concentradas (10-20%) irritaram a pele humana, e causaram dermatite de contato e outros tipos de reações de hipersensibilidade imunológica foram reportados. (FUCHS, 1998). Entretanto, na literatura não há referência de estudos sistêmicos sobre que correlacionem o efeito da concentração de  $\alpha$ -tocoferol na permeação cutânea.

A aplicação do acetato de tocoferol na pele de rato após exposição à radiação UVB reduziu o eritema associado à vermelhidão na pele, observado 24 a 48h, após a aplicação. Outros autores têm também relatado efeito similar, incluindo as formas não esterificadas do tocoferol e ainda mostrado aumento nos níveis de tocoferol livre na pele, seguido de aplicação tópica do acetato de tocoferol. Estes efeitos incluem, também, a redução de incidência de câncer de pele por aplicação tópica deste. (TREVITHICK e MITTON, 1993).

Segundo HANSON e CLEGG (2003), a adição de antioxidantes como o acetato de tocoferol e ascorbil fosfato de sódio aumentaram a fotoproteção, por se converterem em vitaminas E e C, respectivamente, na pele.

LIN *et al.* (2003), reportaram a combinação de antioxidantes (L-ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol) otimizando com a concentração e o pH máximo para efeitos fotoprotetores. Demonstraram que esta combinação é superior a cada antioxidante quando utilizado isoladamente. A combinação promove uma proteção quatro vezes maior contra a produção de eritema produzido pela radiação solar simulada quando comparada ao veículo e inibe a geração ou acúmulo de dímeros de timina na pele.

## 2.4. A INFLUÊNCIA DA FORMULAÇÃO NA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS FILTROS SOLARES E DO ACETATO DE TOCOFEROL.

O sítio de ação desejável dos filtros solares é restrito à superfície da pele ou entre somente as camadas superiores do estrato córneo (JIANG *et al.*, 1998). Segundo JACOBI *et al.* (2004), para proteção solar máxima e mínima permeação de filtros UV a quantidade penetrada deve remanescer nas camadas mais externas do estrato córneo.

Tem sido demonstrado, entretanto, que a penetração na pele e a retenção de agentes de proteção solar de produtos comerciais pode diferir significativamente entre as formulações usadas (JIANG *et al.*, 1998). Até hoje, estes compostos têm sido rotineiramente testados por sua habilidade de evitarem eritemas em peles expostas à radiação UV.

A habilidade de um soluto em uma formulação tópica permear a pele e exercer seu efeito depende tanto das propriedades físico-químicas do agente bioativo, quanto de outros fatores relacionados com a composição do veículo (BRINON *et al.*, 1999).

Há uma necessidade de entender melhor a eficácia e segurança dos produtos de proteção solar, e pelo seu extensivo uso, uma atenção maior tem sido dada ao potencial de permeação de filtros UV através da pele e seus subseqüentes efeitos tóxicos (HAYDEN. *et al.*, 1994).

Protetores solares modernos promovem um amplo espectro de proteção UV e podem conter um ou vários filtros UV que são selecionados com base na sua retenção no estrato córneo para serem formulados com taxas de penetração baixas a negligenciáveis. Estes devem ser fotoestáveis, resistentes à água, não tóxicos e fáceis de formular. O aspecto mais importante no desenvolvimento de um novo filtro é a segurança.

Segundo SARVEIJA *et al.* (2004), é vantajoso quantificar a penetração entre os tecidos da pele e a distribuição sistêmica dos filtros solares seguidos da aplicação tópica. Isto auxilia na determinação da exposição dos tecidos viáveis a estes, provê um melhor entendimento do potencial de toxicidade tanto local quanto sistêmico e facilita o desenvolvimento de novas formulações.

Segundo GUPTA *et al.* (1999), o estudo de permeação cutânea de filtros solares é de interesse pela sua freqüente administração em grandes áreas do corpo.

Em relação ao acetato de tocoferol, RANGARAJAN e ZATZ, (2001) observaram que o mesmo, foi metabolizado em  $\alpha$ -tocoferol na pele do porco e sua taxa e extensão de bioconversão foram dependentes da formulação. Nenhum metabolismo foi detectado no estrato córneo. Já um gel hidroalcoólico com salicilato de octila proporcionou um significativo aumento de liberação do  $\alpha$ -tocoferol no fluido receptor. Observou-se que em geral, filtros solares não afetam significativamente a permeação do  $\alpha$ -tocoferol.

Os veículos naturalmente podem modificar as propriedades do estrato córneo, por exemplo, aumentar a hidratação, a qual pode influenciar no perfil de penetração dos ingredientes ativos (DUPUIS *et al.*, 1986).

Filtros UV são amplamente incorporados em produtos para pele destinados para o uso diário nas formas de emulsões, géis, óleos, com um adequado fator de proteção solar e alta substantividade a pele. Entretanto, tem sido demonstrado que a permeação através da pele e a retenção dos filtros UV na pele podem diferir significativamente entre as formulações utilizadas (CHATELAIN *et al.*, 2003).

HAYDEN *et al.* (1997), aplicaram uma concentração seis vezes maior que a de rotina para medida de FPS ( $2\text{mg}/\text{cm}^2$ ), encontraram absorção sistêmica da benzofenona-3 excedendo um período de 10h, representando entre 1 e 2% da dose aplicada. A penetração percutânea do salicilato de octila através da pele humana viável excedendo um período de 48h foi menor que 1% da dose aplicada (WALTERS *et al.*, 1997).

A absorção do metoxicinamato de octila e da benzofenona-3 foi estudada em humanos usando a técnica de *tape stripping*. A retenção no estrato córneo foi muito maior que a concentração nas outras camadas da pele e no estudo *in vitro* utilizando uma pele humana com espessura de 500  $\mu\text{m}$ , várias emulsões o/a e a/o tiveram quantidades idênticas de metoxicinamato de octila na derme. Entretanto, a deposição no estrato córneo da emulsão o/a foi três vezes maior do que a emulsão a/o (LAZAR *et al.*, 1996).

TREFFEL e GABARD,(1996) utilizaram tanto métodos *in vitro* como *in vivo* para estudar a penetração cutânea de três filtros solares em dois veículos, um gel creme o/a e um gel de petrolato. A penetração através do estrato córneo foi maior com a formulação de petrolato, enquanto a retenção no estrato córneo foi menor com este veículo.

TREFFEL e GABARD,(1996) demonstraram que agentes de proteção solar foram mais retidos no estrato córneo usando uma formulação do tipo emulsão do que utilizando um gel de vaselina. LAZAR *et al.* (1996), demonstraram diferenças na penetração de cinco filtros UV entre formulações do tipo emulsão a/o e o/a. Durante análises de produtos de mercado, JIANG *et al.* (1999), também encontraram que a difusão de filtros UV através da epiderme varia significativamente com o tipo de formulação. HAYDEN *et al.* (1997) encontraram que em humanos mais de 2% da dose aplicada de benzofenona-3 e seus metabólitos foram excretados na urina seguida de aplicação tópica de um produto de mercado.

Produtos de proteção solar contêm uma variedade de filtros UV para aumentar a faixa de proteção solar, aumentar o fator de proteção solar e reduzir a concentração de alguns filtros UV em vista aos seus riscos toxicológicos. (NOHYNEK *et al.*, 2001). É evidente que no desenvolvimento de futuras formulações é almejado formular veículos que permitam a penetração de filtros UV somente nas partes mais externas do estrato córneo. Ao mesmo tempo, os filtros UV devem ser retidos nesta localização e sua permeação através da pele deve ser prevenida. (CHATELAIN *et al.*, 2003).

A penetração depende amplamente das características físico-químicas dos compostos permeantes. A aplicação de modelos matemáticos tem indicado que pode ter ampla diferença nas quantidades de agentes de proteção solar que podem atravessar a pele (WATKINSON *et al.*, 1992). Estes modelos, entretanto, não levam em consideração o veículo no qual o agente de proteção solar é aplicado. Este fator, muito importante em termos de avaliação de risco, pode ser somente determinado experimentalmente (*in vitro* e *in vivo*) (GETTING *et al.*, 1993; TREFFEL e GABARD, 1996 a,b).

## 2.5. TIPOS DE VEÍCULOS

Segundo SCHUELLER e ROMANOWSKI (2000), emulsões são veículos mais comuns para incorporação de filtros solares. Baseiam-se em uma mistura de óleos e água, estabilizadas por um emulsificante.

Embora a tecnologia das emulsões seja conhecida há séculos, foi somente na década de 20, com a introdução dos primeiros filtros solares orgânicos, que elas puderam ser usadas como veículos para estes, devido à sua versatilidade.

Proporcionam uma excelente película protetora sobre a pele, têm excelente apresentação e são relativamente baratas. Um dos pontos fracos é a dificuldade de estabilização.

Os géis são uma alternativa às emulsões para a incorporação dos filtros solares. São produtos espessos e transparentes, sendo de forte apelo aos consumidores. A principal vantagem sobre as emulsões é a sua transparência e aspecto exclusivo. Há grandes desvantagens limitando seu uso, como não produzirem película protetora à prova d'água, não formarem películas uniformes e pelo espessamento, darem uma sensação de viscosidade à pele.

As soluções, entre as quais se encontram as alcoólicas, mesmo não sendo as principais formulações utilizadas em cosméticos, têm algumas vantagens como de permanecerem fisicamente estáveis e serem de fácil preparo (BAREL *et al.*, 2001).

## 2.6. TÉCNICAS PARA O ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA.

Conhecidamente para os testes de permeação cutânea utilizam-se técnicas *in vitro* e *in vivo*.

As técnicas *in vitro* utilizam células de difusão, as quais consistem de um líquido receptor e uma fase doadora separadas por membrana sintética ou pele. Quando solutos lipofílicos são investigados, como no caso de muitos filtros solares, modificadores de solubilidade são utilizados com o fluido receptor para promover uma adequada solubilidade e garantir as condições de penetração. (SARVEIJA *et al.*, 2004).

É geralmente aceito que o estrato córneo é a maior barreira protetora prevenindo a penetração de vários compostos através da pele. Vários métodos foram usados por cientistas para avaliar a taxa de absorção de um ingrediente ativo através da pele: *in vivo*, utilizando animais ou voluntários humanos e *in vitro* (LAZAR *et al.*, 1998).

ROUGIER *et al.* (1987), mostraram que a absorção total de uma substância pode ser predita por um simples *stripping* da área tratada e a quantidade medida de produto na camada córnea ao final de 30 minutos de um período de aplicação. Por esta técnica, notaram que esta relação é dependente de muitos fatores suscetíveis que podem influenciar a penetração percutânea: tempo de aplicação, veículo e local anatômico envolvido.

A técnica de *tape stripping* é minimamente invasiva e muito útil para o estudo da penetração, distribuição e dermatofarmacocinética de produtos cosméticos aplicados topicamente (WEIGMANN *et al.*, 2005).

Em geral, a quantidade de estrato córneo removido por *tape stripping* depende de uma variedade de parâmetros como tipo do adesivo usado bem como as diferenças na estrutura do estrato córneo inter-indivíduos e inter-sazonais (BASHIR *et al.*, 2001). Além disso, o veículo utilizado na aplicação pode ter um efeito significativo na coesão entre os corneócitos e na adesão entre os mesmos e a fita adesiva (JACOBI *et al.*, 2005).

As características de permeabilidade da pele humana têm sido razoavelmente bem estabelecidas e tem sido extensivamente revisada (BARRY, 1987; WESTER e MAIBACH, 1992).

O estrato córneo apresenta uma considerável barreira lipofílica à permeação de substâncias químicas. Por outro lado, a epiderme viável, a qual esta imediatamente abaixo do estrato córneo é hidrofílica e pode atuar como um passo limitante na absorção de drogas altamente lipofílicas. O resultado de uma característica ótima de absorção percutânea é o permeante ser razoavelmente solúvel em ambos os meios hidrofílicos e hidrofóbicos, o qual é intimamente ligado com o coeficiente de partição o/a do permeante ( $\log P$ ) (ROBERTS, 1991). Esta suposição é apoiada por informações presentes por YANO *et al.* (1986), o qual encontrou que a permeação cutânea da pele humana de salicilatos e drogas anti-inflamatórias acima de 4 horas, requer um  $\log P$  alto.

Segundo SATO *et al.* (1991), a permeabilidade da pele de orelha de porco tem sido amplamente estudada e esta membrana tem provado ser um bom modelo animal para simular a pele humana. Estudando a permeação cutânea do nicorandil, utilizado para prevenir e tratar angina, observou-se que os resultados de permeabilidade cutânea do mesmo através de pele humana foram bem próximos aos resultados obtidos utilizando pele de orelha de porco. Ambas apresentam uma superfície lipídica similar bem como, espessura de barreira e aspectos morfológicos similares, então sugere-se a utilização da pele de orelha de porco para a estimativa do comportamento *in vitro* da pele humana.

Ainda, devido à semelhança com a pele humana em termos de densidade de folículos pilosos, a pele de orelha de porco, principalmente quando jovem, tem sido

utilizada como modelo de membrana para estudos de permeação *in vitro* e *in vivo*. (LOPES e KANEKO, 2000).

GUPTA *et al.*, (1999), desenvolveram um modelo *in vitro* da pele de orelha de porco para estudo da permeação cutânea de filtros solares e avaliaram a influência de diferentes formulações. Relataram que apesar da alta natureza lipofílica dos filtros solares, o estrato córneo é a camada da pele limitante para a penetração e que foram dependentes da formulação.





### 3.OBJETIVO

#### 3.1.OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo verificar por ensaios *in vitro* e *in vivo* a influência de diferentes formulações na permeação e retenção cutânea de filtros solares associados ao acetato de tocoferol.

#### 3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir e desenvolver as formulações
- Caracterizar o coeficiente de partição óleo/água e estrato córneo/veículo dos filtros solares e do acetato de tocoferol.
- Validar os métodos analíticos para quantificação dos filtros solares e do acetato de tocoferol nas amostras por CLAE
- Definir os parâmetros para o estudo de permeação cutânea *in vitro*
- Verificar a permeação cutânea *in vitro* dos veículos contendo os filtros solares e o acetato de tocoferol, individualmente.
- Fazer a comparação dos resultados obtidos entre os veículos para verificar os diferentes graus de permeação e retenção cutânea.
- Avaliar *in vivo* a retenção cutânea dos filtros solares e do acetato de tocoferol, através da técnica de *tape stripping*.
- Comparar os resultados obtidos *in vitro* e *in vivo*
- Identificar o veículo que favoreça a permeação cutânea do acetato de tocoferol e retenha os filtros solares sob a superfície cutânea e estrato córneo.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas:

Manipulação da emulsão o/a

- Água deionizada-q.s.p
- Butil metoxidibenzoilmetano 2% (m/m) – (ROCHE® - grau de pureza mínimo 95%)
- Octocrileno 2% (m/m) – (ROCHE® - grau de pureza mínimo 95%)
- 4-metilbenzilideno cânfora 4% (m/m) – (ROCHE®-grau de pureza mínimo 98%)
- Acetato de tocoferol 3% (m/m) – (BASF® - grau de pureza mínimo 96%)
- Octil triazona -3%
- BHT -0,05%
- EDTA dissódico-0,1%
- Trietanolamina- 1%
- Adipato de dibutila -11%
- Propilenoglicol -3%
- Cetilfosfato de potássio-2%
- Álcool cetílico-0,5%
- Álcool estearílico-0,5%
- Crespolímero de acrilatos C10-30/acrilato de alquila-0,3%
- 2-fenoxietanol-0,8%
- Metilparabeno-0,2% (grau farmacêutico de pureza)
- Propilparabeno- 0,1% (grau farmacêutico de pureza)
- Fragrância -0,2%

### Manipulação do gel alcoólico

- Alcool etílico-q.s.p
- Hidroxipropilcelulose-1,5%
- 4-metilbenzilideno cânfora 4% (m/m) – (ROCHE®- grau de pureza mínimo 98%)
- Octocrileno 2% (m/m)-(ROCHE®- grau de pureza mínimo 95%)
- Butil metoxidibenzoilmetano 2% (m/m)-(ROCHE®- grau de pureza mínimo 95%)
- Acetato de tocoferol 3% (m/m)-(BASF®- grau de pureza mínimo 96%)
- Octil triazona-3%
- BHT-0,05%
- Adipato de dibutila-10%
- Glicerol-1,5%
- Butilenoglicol-1,5%
- Copolímero de acrilatos/octilacrilamida-1%
- Fragrância -0,2%

### Manipulação do fluido alcoólico

- Álcool etílico-q.s.p
- Acetato de tocoferol 3% (m/m)- (BASF®-grau de pureza mínimo 96%)
- 4-metilbenzilidêno cânfora 4% (m/m)-(ROCHE®- grau de pureza mínimo 98%)
- Butil metoxidibenzoilmetano 2% (m/m)-(ROCHE®- grau de pureza mínimo 95%)
- Octocrileno 2% (m/m)- (ROCHE®- grau de pureza mínimo 95%)
- Octil triazona -3%
- Isononanoato de octila-8%
- Copolímero de acrilatos/octilacrilamida-1%
- Adipato de dibutila-4%
- Fragrância -0,2%

#### Permeação cutânea *in vitro*

- Fosfato de potássio monobásico-P.A
- Hidróxido de sódio-P.A
- Metanol - grau CLAE
- Polietilenoglicol 20 oleil éter
- Álcool etílico-Usina Ester

#### Doseamento por CLAE

- Isopropanol- grau CLAE
- Água-MilliQ®
- Metanol-grau CLAE
- Ácido acético glacial P.A
- Ácido ortofosfórico P.A

#### Permeação cutânea *in vivo*

- Metanol-grau CLAE
- Isopropanol-grau CLAE

#### 4.1.2. Equipamentos e acessórios

##### Para manipulação e caracterização dos veículos

- Agitador mecânico- IKA®-modelo RW 20.n
- Balança analítica-GEHAKA®-modelo BG 4400
- Chapas de aquecimento
- Viscosímetro BROOKFIELD® - modelo RVT.
- pHmetro METTLER TOLEDO®-modelo MP220.

Para permeação cutânea *in vitro*

- Bisturi
- Tesoura cirúrgica
- Lâmina para bisturi tamanho 21
- Pinça anatômica
- Fita adesiva – Scotch 3M®
- Sistema de células de difusão *in vitro* - Microette Plus-HANSON RESEARCH®
- Balança analítica-Bosch®-modelo SAE 200
- Dispensador automático ajustável de 10-5000 µl-Raining® Auto REP M
- Pele de orelha de porco albino adulto, obtidas em abatedouro autorizados pelo Ministério da Agricultura para fins de consumo humano.

Para doseamento por CLAE

- Banho ultra-som-BRANSON®-modelo 3510
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 100-1000 µL -BRAND®
- Membranas filtrantes de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm - AGILENT RC®
- Filtro de seringa de porosidade de 0,2µm -SARTORIUS RC® 15
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência-AGILENT® 1100 acoplado a um detector ultravioleta com comprimento de onda variável
- Coluna cromatográfica-C18 de fase reversa-BECKMAN COULTER®-modelo ODS-5µ-4,6mmx25cm.

Para permeação cutânea *in vivo*

- Aparelho de perda transepidermal de água - VapoMeter Wirelles® –Delfin Technologies
- Adesivos de *stripping*-D-Squame® 22mm.
- Micropipeta automática ajustável de 100-1000 µL-BRAND®
- 5 voluntárias, sexo feminino, caucasianas, adultas (25 a 35 anos),

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Processo de fabricação dos veículos

Emulsão o/a:

A fase oleosa foi composta pelo butil metoxidibenzoilmetano, 4-metilbenzilideno cânfora, acetato de tocoferol, adipato de dibutila, álcool estearílico, álcool cetílico, octil triazona, octocrileno e BHT e aquecida até 80-85°C.

Mistura 1: propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno e agitado até completa solubilização.

Mistura 2: trietanolamina e parte da água, agitando até completa solubilização.

Na fase aquosa, foram adicionados o EDTA dissódico e o crospolímero de acrilatos C10-30 e submetidos à agitação até completa solubilização. Em seguida, sob aquecimento à temperatura entre 80-85°C, foram adicionados os componentes da mistura 1, o 2-fenoxietanol e o cetilfosfato de potássio e mantidos sob agitação por 5 minutos, com agitador mecânico.

Quando a temperatura de ambas as fases atingiu 80°C a 85°C, a fase oleosa foi vertida sob a fase aquosa e foi mantida uma agitação de 800 a 900 rpm por 5 minutos.

Em seguida, foi adicionado a mistura 2 e uma agitação de 1200 a 1400 rpm foi mantida por 20 minutos. Posteriormente, iniciou-se o processo de resfriamento até 30-35°C, sob agitação.

Gel alcoólico:

A fase oleosa foi composta pelo butil metoxidibenzoilmetano, 4-metilbenzilideno cânfora, adipato de dibutila, acetato de tocoferol, octil triazona, octocrileno e BHT e aquecida até 80-85°C sob agitação até completa solubilização de todos os componentes.

Em outro recipiente foi adicionado o álcool etílico e a hidroxipropilcelulose e mantidos sob agitação até completa solubilização.



Em seguida, foi adicionado o copolímero de acrilatos/octilacrilamida e mantido sob agitação de 800 a 900 rpm por 15 minutos.

Sob agitação foram adicionados o butileno glicol e o glicerol e a agitação de 800 a 900 rpm foi mantida por mais 5 minutos.

A fase oleosa, já resfriada a uma temperatura de aproximadamente 50°C foi adicionada sob a fase alcoólica e uma agitação de 800 a 900 rpm foi mantida por 10 minutos.

A 45°C foi adicionado a fragrância, sob agitação por mais 15 minutos.

Fluido alcoólico:

A fase oleosa foi composta pelo octocrileno, 4-metilbenzilideno cânfora, octil triazona, butil metoxidibenzoilmetano, acetato de tocoferol, adipato de dibutila e isonanoato de octila e aquecida até 80-85°C, sob agitação até completa solubilização dos componentes.

Em outro recipiente foi adicionado o álcool etílico e a fragrância.

A fase oleosa, já resfriada a aproximadamente 50°C, foi adicionada a fase alcoólica e mantida sob agitação de 400 a 480 rpm por 10 minutos.

#### 4.2.2. Estabilidade dos veículos

Os três veículos foram submetidos a um acompanhamento de 90 dias de estabilidade nas seguintes condições: 23°C, 4°C, luz UV, luz dicróica, 37°C, 45°C e 50°C. Foram avaliadas tanto as características físicas como as organolépticas.

#### 4.2.3. Determinação das características organolépticas e físicas dos veículos.

Os parâmetros organolépticos analisados foram: aspecto, cor e odor. As características físicas foram definidas pelos parâmetros de viscosidade e pH

#### 4.2.4. Caracterização físico-química do octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano, 4-metilbenzilideno cânfora e do acetato de tocoferol.

#### 4.2.4.1. Determinação do coeficiente de partilha óleo/água.

Esta determinação foi baseada no método de CLAE descrito no *OECD Guideline* (1989), para teste de substâncias químicas.

O método foi realizado com uma coluna analítica contendo uma fase sólida de cadeia longa de hidrocarbonetos (C18) quimicamente ligada em sílica.

Os filtros 4-metilbenzilideno cânfora e butil metoxidibenzoilmetano, bem como os compostos utilizados como referência, que foram o álcool benzílico e o benzoato dietilamino hidroxibenzoilhexil, com valores de log P menores e maiores que os compostos em análise, foram injetados na coluna e moveram-se ao longo da mesma por partição entre a fase móvel e a fase estacionária.

Previamente o valor dos coeficientes de partição da 4-metilbenzilideno cânfora e do butil metoxidibenzoilmetano foram estimados utilizando métodos de cálculos matemáticos (*SRC's LogKow -KowWin Program*<sup>®</sup>).

Para a determinação do coeficiente de partição da 4-metilbenzilideno cânfora e do butil metoxidibenzoilmetano, a fase móvel foi composta de metanol grau CLAE e água destilada, a qual foi sonicada antes do uso, na proporção de metanol-água 75:25 (v/v) com uma taxa de fluxo de 1ml/min.

Para determinação do coeficiente de partição do acetato de tocoferol e do octocrileno foram utilizados apenas cálculos matemáticos (*SRC's LogKow -KowWin Program*<sup>®</sup>), pois os mesmos não foram solúveis na fase móvel descrita acima como preconiza a técnica.

Foi utilizado a tiouréia como referência de composto orgânico com tempo de retenção próximo a zero para ser o valor de  $t_0$ .

Para os cálculos determinou-se:

$$K \text{ (fator de capacidade)} = (t_R - t_0) / t_0$$

Onde,  $t_R$  é o tempo de retenção das substâncias em análises e  $t_0$  é o tempo médio que uma molécula solvente necessita para passar pela coluna.

Com o objetivo de correlacionar o fator de capacidade ( $k$ ) medido de um composto com seu  $P_{o/a}$  (coeficiente de partilha óleo/água), um gráfico de calibração foi estabelecido.

Em seguida foi plotado um gráfico correlacionando log K pelo log P para os compostos de referência. Os logaritmos correspondentes dos fatores de capacidade, log K, foram calculados e plotados como função de log P.

Os ativos foram injetados na concentração de 0,3 mg/ml sendo que o tempo de retenção de cada um deles, foi determinado em triplicata. O coeficiente de partição do butil metoxidibenzoilmetano e da 4-metilbenzilideno cânfora foram obtidos por interpolação do gráfico de calibração do fator de capacidade calculado.

#### 4.2.4.2. Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo

Esta determinação foi baseada no método proposto de SHEUPLEIN *et al.*, (1969), onde amostras do estrato córneo ralado (100mg) do calcanhar de um *pool* de dez pessoas, foram colocadas em tubos de extração contendo separadamente 200mg de cada veículo nas formas de emulsão o/a, gel e fluido alcoólico, diluídos em 100ml de água milliQ®. As preparações foram submetidas a um processo de agitação durante 20 minutos. Em seguida, foram filtradas em papel de filtro e posteriormente em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm. Foi retirada uma alíquota do filtrado e realizada a análise da quantidade de ativo não partilhado no estrato córneo ( $P_{ec/veículo}$ ) por CLAE.

4.2.4.3. Solubilidade do octocrileno, 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e acetato de tocoferol para determinação da solução receptora.

Para a averiguação da solubilidade dos filtros solares e do acetato de tocoferol empregou-se a técnica descrita pela USP XXIX. Este ensaio foi realizado para determinar o fluido receptor ideal para a realização do estudo de permeação cutânea *in vitro*.

A solução receptora empregada no experimento, foi uma mistura etanólica, adicionada a um fluido receptor fisiológico (solução tampão fosfato pH 7,4), e um agente modificador de solubilidade (polietilenoglicol 20 oleil éter-Volpo 20®).

A quantidade dos ativos utilizada para este teste, foi determinada de acordo com as suas concentrações nos veículos em estudo (4% de 4-MC, 3% de AcT, 2%

de OC e 2% de BMDM), para uma quantidade de  $\pm 40\text{mg}$  ( $\pm 20\text{mg/cm}^2$ ) de produto, que foi a dose infinita utilizada posteriormente nos experimentos *in vitro*. O volume da solução receptora utilizada para o teste de solubilidade foi correlacionado com o volume total da célula de difusão ( $\pm 7\text{ml}$ ).

O AcT, OC, BMDM e 4-MC foram previamente pesados e colocados em contato com diferentes proporções das misturas de soluções receptoras, bem como em contato com o mesmo volume de isopropanol, utilizado como comparativo, pois os ativos em questão são solúveis no mesmo. Ficaram sob agitação mecânica, a  $32^\circ\text{C}$  por 30 minutos até a máxima solubilização dos mesmos. Posteriormente os mesmos foram doseados por CLAE.

#### 4.2.5. Estudo de permeação cutânea *in vitro*

Os experimentos para o estudo de permeação cutânea *in vitro* foram realizados por difusão em pele de orelha de porco, sem pêlo e devidamente limpa. Foi empregado sistema de células de difusão-Microette Plus-Hanson Research ®.

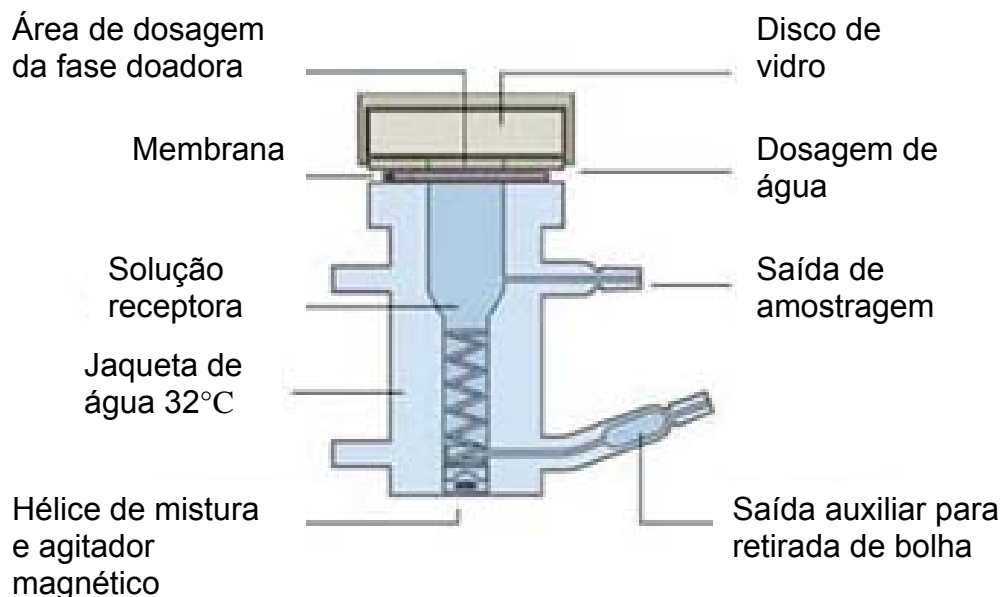


FIGURA 1. CÉLULA DE DIFUSÃO EMPREGADA NOS ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*.

#### 4.2.5.1. Empregando os ativos incorporados nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

As membranas (pele da orelha de porco sem pêlo) foram colocadas adequadamente nas células de difusão, com o lado da derme em contato com a solução receptora, previamente selecionada no teste de solubilidade, que consistiu de tampão fosfato 0,2M, pH 7,4 com 10% de polietilenoglicol 20 oleil éter e 50% de álcool etílico. A fase doadora foi uma dose infinita de 40 mg (20mg/cm<sup>2</sup>) das diferentes formulações empregadas: emulsão o/a, gel e fluido alcoólico, descritas nos itens 4.1.1.1, 4.1.1.2, 4.1.1.3, respectivamente. Todas continham 4%(m/m) de 4-MC, 2%(m/m) BMDM, 2%(m/m) de OC e 3%(m/m) de AcT. Para cada veículo foram utilizadas de 5 a 6 células de difusão no estudo, sendo sempre uma delas utilizada como controle. Para a aplicação homogênea da emulsão o/a, gel e fluido alcoólico sobre a pele, foi utilizado um pequeno bastão, ficando o mesmo após aplicação, em contato com 4ml da solução receptora sendo submetido à sonicação por 30 minutos, para total extração dos ativos, posteriormente identificados e quantificados por CLAE. Os experimentos foram conduzidos a 32° C e a solução receptora (7,0ml) foi constantemente agitada por agitador magnético a 300rpm. As amostras da solução receptora foram coletadas em um período de 0h, 5h, 8h e 23h e as quantidades de BMDM, OC, 4-MC e AcT presentes foram determinadas e identificadas por CLAE.

Em 8h de experimento, as peles expostas sobre as células de difusão foram lavadas com 3 ml da solução receptora, com objetivo de retirar o excesso que permaneceu sobre a superfície e não sofreram retenção cutânea. O volume proveniente desta lavagem contendo os ativos retirados foi submetido à sonicação por 30 minutos e posteriormente identificados e quantificados por CLAE.

4.2.6. Estudos de retenção cutânea *in vitro* dos ativos incorporados nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

4.2.6.1. Retenção no estrato córneo - *tape stripping*

Após os experimentos de permeação cutânea *in vitro* (23h) as peles foram retiradas das células de difusão. As áreas expostas à difusão (2,01cm<sup>2</sup>) foram isoladas e as camadas do estrato córneo foram removidas através de fitas adesivas Scotch 3M<sup>®</sup> (aproximadamente 40 remoções), que foram colocadas em um frasco contendo metanol e submetidas à sonicação por 30 minutos, para promover a lise das células e conseqüentemente, garantir a completa extração dos ativos em estudo. Após a sonicação, os frascos foram levados ao banho-maria até completa evaporação do metanol. Posteriormente, 4 ml da solução receptora foi adicionada aos frascos, afim de resolubilizar os ativos. Os mesmos foram sonicados novamente por mais 30 minutos e finalmente quantificados por CLAE. Os tempos de agitação e o volume de solvente extrator foram padronizados para ocorrer à máxima extração dos ativos.

4.2.6.2.. Retenção na [epiderme sem estrato córneo +derme]

Após a retirada do estrato córneo, como descrito no item anterior, a área de exposição foi recortada e picotada, e os fragmentos obtidos foram misturados com metanol e submetidos a sonicação por 30 minutos, para ocorrer o rompimento das células e conseqüente liberação dos ativos. Após sonicados, os frascos foram levados ao banho-maria até completa evaporação do metanol. Posteriormente, 4 ml da solução receptora foi adicionada aos frascos, afim de resolubilizar os ativos. Os mesmos foram sonicados novamente por mais 30 minutos e quantificados por CLAE. Os tempos de agitação e o volume de solvente extrator foram padronizados para ocorrer à máxima extração dos ativos.

#### 4.2.7. Estudo de permeação cutânea *in vivo*

##### 4.2.7.1. Verificação da integridade dérmica por avaliação da perda de água transepidermal

Às cinco voluntárias que participaram do teste de permeação cutânea *in vivo*, não poderiam apresentar irritação, alergia ou patologia cutânea e foram submetidas ao teste de perda transepidermal de água (TEWL), pelo aparelho VapoMeter Wirelles<sup>®</sup>. As voluntárias não utilizaram nenhum tipo de produto nos antebraços uma semana antes de iniciar o teste.

- 1- Limpeza somente com água da região anterior dos antebraços das voluntárias e repouso em ambiente climatizado (Temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$  e umidade relativa de  $55\text{ }\%\pm 5$ ) durante 30 minutos.
- 2- Demarcação de três sítios nas regiões anteriores dos antebraços (três sítios em cada antebraço).
- 3- Leitura do TEWL nos sítios demarcados.

Este teste indicou a integridade cutânea das voluntárias, sendo este um critério de inclusão ou exclusão para participação dos mesmos no estudo.

##### 4.2.7.2. Estudo de permeação cutânea *in vivo* por técnica de *tape stripping*

Após a verificação da integridade cutânea às cinco voluntárias permaneceram em uma sala climatizada por 30 minutos. Sete regiões de  $\pm 4\text{ cm}^2$  dos antebraços direito e esquerdo foram delimitadas e aleatorizadas sendo sempre uma das regiões utilizadas como controle.

Os estudos *in vivo* dos três veículos foram realizados em cada voluntária, sendo que, em cada uma das regiões delimitadas nos antebraços das mesmas, foram aplicados aproximadamente 16mg do veículo em estudo, sendo, portanto, uma dose finita de aproximadamente  $4\text{ mg/cm}^2$  de produto. Os veículos em estudo, ficaram em contato com a pele das voluntárias da seguinte maneira: das sete regiões delimitadas, três estiveram em contato com os veículos por 30 minutos, as outras três regiões estiveram em contato com os veículos por 4h, e a região restante foi

utilizada como controle. O produto foi aplicado com auxílio de dedeiras, que posteriormente foram colocadas em frascos contendo isopropanol. Estes frascos foram sonicados e os ativos presentes foram identificados e quantificados por CLAE.

Em seguida, finalizado cada tempo de contato acima citado, iniciou-se as remoções do estrato córneo com as fitas adesivas. As duas primeiras fitas adesivas foram doseadas separadamente das demais, pois foi considerado que os ativos presentes nestas duas fitas estavam sobre a superfície e não sofreram retenção cutânea.

Após a remoção dos ativos da superfície cutânea, foram realizadas as remoções do estrato córneo com fita adesiva D-squame<sup>®</sup> (aproximadamente 20 remoções), sempre sendo desprezada as duas primeiras remoções em cada um dos tempos, mas posteriormente doseadas e quantificadas por CLAE.

Os adesivos provenientes das remoções do estrato córneo, foram colocados em contato com metanol para ocorrer a lise das células e a conseqüente extração dos ativos. Os frascos contendo as fitas removidas, em 30 minutos e 4h de contato, foram sonicados por 30 minutos e colocados em banho-maria até completa evaporação do metanol. Posteriormente, foi feita a resolubilização dos ativos com isopropanol, submetidos novamente a sonicação por 30 minutos e então realizados os doseamentos por CLAE.

O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do setor de ciências da saúde da UFPR, registro CEP/SD:02.220SM095(02)06-02-02A.FR:83115 CAE 0001.0.091.000-06

4.2.8. Padronização do método para análise do octocrileno, butil metoxidibenzoilmetano e 4-metilbenzilideno cânfora por CLAE .

Para o doseamento dos ativos 4-MC, OC e BMDM as condições cromatográficas foram:

- Coluna cromatográfica C18 de fase reversa-BECKMAN COULTER<sup>®</sup>- modelo ODS-5 $\mu$ -4,6mmx25cm.
- Fase móvel: metanol/água/ácido acético (850:150:5)
- Fluxo de 1,5ml/min
- Detecção por UV no comprimento de onda de 388 nm



A fase móvel foi preparada com metanol e ácido acético previamente filtrado e com água filtrada e purificada em sistema Milli-Q®. A mistura obtida foi deaerada sob sonicação por 20 minutos.

#### 4.2.9. Padronização do método para análise do acetato de tocoferol por CLAE.

Para o doseamento do acetato de tocoferol, as condições cromatográficas foram:

- Coluna cromatográfica C18 de fase reversa-BECKMAN COULTER®- modelo ODS-5 $\mu$ -4,6mmx25cm
- Fase móvel: metanol/isopropanol/ácido fosfórico (500:500:5)
- Fluxo de 1,0ml/min
- Detecção por UV no comprimento de onda de 254 nm

A fase móvel foi preparada com metanol, isopropanol e ácido fosfórico filtrados. A mistura obtida foi deaerada sob sonicação por 20 minutos.

#### 4.2.10. Validação dos métodos de doseamento dos ativos

Para validação dos métodos de doseamento dos filtros solares e do acetato de tocoferol, foram realizados os estudos de: especificidade, exatidão, precisão, linearidade e faixa, limite de quantificação e robustez, segundo parâmetros preconizados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) que constam na USP XXV.

#### 4.2.11. Análise estatística dos dados

Para realizar a análise estatística dos dados utilizou-se ANOVA, seguido de *post-hoc* de Tukey.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS E FÍSICAS DOS VEÍCULOS.

Emulsão o/a

Características organolépticas:

- Aspecto: creme opaco
- Cor: branca
- Odor: característico

Características físicas:

- pH: 6,8
- Viscosidade: 14.000 cP (Brookfield RVT, spin #5/20rpm/30")

Gel alcoólico

Características organolépticas:

- Aspecto: gel translúcido
- Cor: levemente amarelada
- Odor: característico

Características físicas:

- pH: 6,89
- Viscosidade: 7.400 cP (Brookfield RVT, spin #4/20rpm/30")

Fluido alcoólico

Características organolépticas :

- Aspecto: liquido fluido transparente
- Cor: levemente amarelada
- Odor: característico.

Características físico-químicas:

- pH: 6,90

Durante os 90 dias avaliados, os três veículos mantiveram suas características físicas e organolépticas.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO OCTOCRILENO, BUTIL METOXIDIBENZOILMETANO, 4-METILBENZILIDENO CÂNFORA E DO ACETATO DE TOCOFEROL.

### 5.2.1 Determinação do coeficiente de partilha óleo/água

Os dados dos coeficientes de partilha, determinados para a 4-MC obtido pelo método descrito na seção 4.2.4.1, está apresentado na **Tabela 1**.

TABELA 1. VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAR O LOG P DA 4-MC.

Ativo	<i>t</i> R	<i>K</i>	Log <i>K</i>	Log <i>P</i>
Tiouréia (t0)	2,36	-	-	-
Álcool benzílico	3,112(±0,005)	0,318(±0,003)	-0,497	* 1,1
BMDM	13,009(±0,008)	4,512(±0,004)	0,654	*4,51
4-MC	30,029(±0,005)	11,7236(±0,002)	1,069	5,71
Benzoato dietilamino hidroxibenzoilhexil	43,195(±0,006)	17,302(±0,002)	1,238	* 6,2

\* Valores de log P obtidos por cálculos matemáticos (SRC's LogKow -KowWin Program ®)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a três determinações.

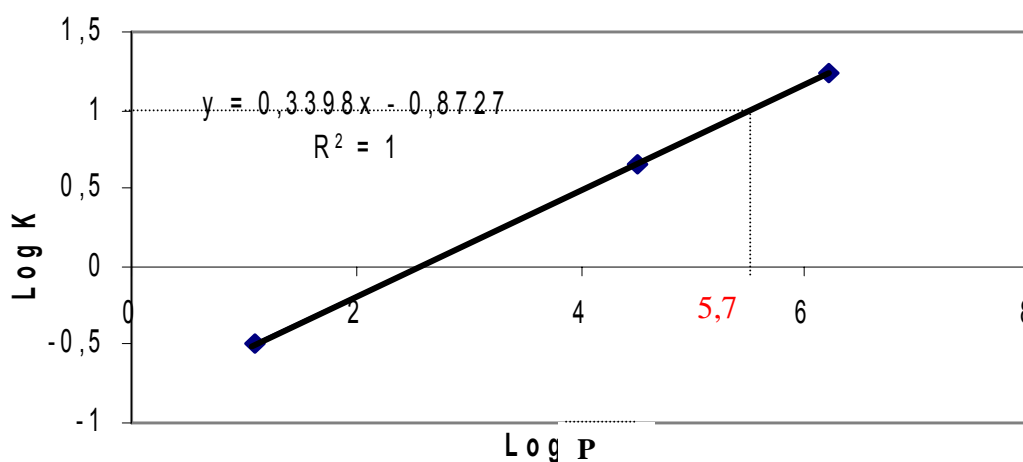


FIGURA 2. VALORES DE LOG P EM FUNÇÃO DE LOG K PARA DETERMINAR O COEFICIENTE DE PARTILHA DA 4-MC.

Os dados dos coeficientes de partilha, determinados para o BMDM obtido pelo método descrito na seção 4.2.4.1, está apresentado na **Tabela 2**.

TABELA 2. VALORES OBTIDOS PARA DETERMINAR O LOG P DA BMDM.

Ativo	<i>tR</i>	<i>K</i>	<i>Log K</i>	<i>Log P</i>
Tiouréia (t0)	2,36	-	-	-
Álcool benzílico	3,112(±0,005)	0,318(±0,003)	-0,497	* 1,1
BMDM	13,009(±0,008)	4,512(±0,004)	0,654	4,55
4-MC	30,029(±0,005)	11,7236(±0,002)	1,069	*5,9
Benzoato dietilaminohidroxibenzoilhexil	43,195(±0,006)	17,302(±0,002)	1,238	* 6,2

\* Valores de logP obtidos por cálculos matemáticos (*SRC's LogKow-KowWin Program*®)

Os valores representam as médias e os desvios referentes a três determinações.

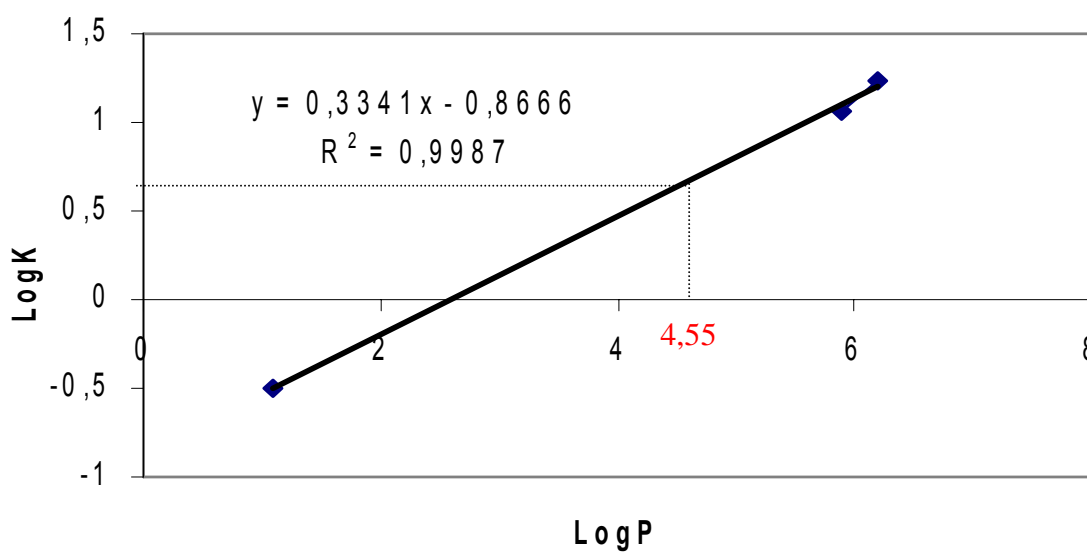


FIGURA 3- VALORES DE LOG P EM FUNÇÃO DE LOG K PARA DETERMINAR O COEFICIENTE DE PARTILHA DO BMDM.

A **Tabela 3** apresenta os valores de log P dos ativos em estudo, comparando os valores obtidos para a 4-MC e para BMDM por cálculos matemáticos e pelo método de CLAE, descrito na seção 4.2.4.1.

TABELA 3. VALORES COMPARATIVOS DE LOG P OBTIDOS POR CÁLCULOS MATEMÁTICOS E POR CLAE.

<i>Ativo</i>	<i>Log P – SRC's LogKoa (KowWin) Program®</i>	<i>Log P- CLAE</i>
BMDM	4,51	4,55
4-MC	5,92	5,71
OC	* 6,88	-
AcT	* 12,26	-

\*Os valores de log P para o OC e AcT foram obtidos por cálculos matemáticos

#### 5.2.2 Determinação do coeficiente de partilha estrato córneo/veículo

A **Tabela 4** apresenta a quantidade não partilhada dos ativos 4-MC, BMDM, OC e AcT no estrato córneo, como descrito na seção 4.2.4.2.

TABELA 4. QUANTIDADE DE ATIVO NÃO PARTILHADO NO EC

<i>log P<sub>ec/veículo</sub> (mg/ml)</i>	<i>Emulsão o/a</i>	<i>Gel alcoólico</i>	<i>Fluido alcoólico</i>
BMBM	0	0	0,00669
4-MC	0	0	0,00437
OC	0	0	0,00418
AcT	0	0	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a três determinações

5.2.3. Solubilidade do octocrileno, 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e acetato de tocoferol para determinação da solução receptora.

A solução receptora selecionada para o experimento foi tampão fosfato pH 7,4 (40%)/ etanol (50%)/polietilenoglicol 20 oleil éter (10%).

Os ativos foram classificados segundo tabela USP XXIX como: Livremente solúvel, sendo 1 a 10 partes do solvente requerida para 1 parte do soluto.

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos da solubilidade dos ativos 4-MC, BMDM, OC e AcT na solução receptora selecionada com um comparativo da solubilidade dos mesmos em isopropanol, como descrito no item **4.2.4.3**.

TABELA 5. VALORES COMPARATIVOS DA SOLUBILIDADE DOS ATIVOS NA SR E EM ISOPROPANOL OBTIDOS POR CLAE.

Ativos	Valor teórico de solubilidade dos ativos na SR (mg/ml)	Solubilidade dos ativos na SR em (mg/ml) e (%)	Valor teórico de solubilidade dos ativos em isopropanol (mg/ml)	Solubilidade dos ativos em isopropanol em (mg/ml) e (%)
BMDM	0,1308(±0,01)	0,114(±0,01) 87,15%	0,1349(±0,008)	0,1347(±0,008) 99,85%
4-MC	0,241(±0,08)	0,234(±0,009) 97,09%	0,2357(±0,01)	0,2353(±0,01) 99,83%
OC	0,1290(±0,005)	0,1179(±0,005) 91,39%	0,1375(±0,01)	0,1359(±0,01) 98,83%
AcT	0,1928(±0,007)	0,1507(±0,005) 78,16%	0,2092(±0,01)	0,2083(±0,01) 99,56%_

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a três determinações.

### 5.3 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

5.3.1. Empregando os ativos incorporados no gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

A **Tabela 6** apresenta os resultados de permeação cutânea *in vitro* da 4-MC, BMDM, OC e AcT, empregando o gel alcoólico e a **Figura 4** ilustra seus perfis de permeação cutânea *in vitro* neste veículo.

TABELA 6. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO

Tempo de coleta (h)	4-MC (µg/cm <sup>2</sup> )	BMDM(µg/cm <sup>2</sup> )	OC(µg/cm <sup>2</sup> )	AcT(µg/cm <sup>2</sup> )
T0h	0	0	0	0
T5h	0,506(±0,05)	0	0	0
T8h	0,626(±0,06)	0	0	0
T23h	2,518(±0,3)	0	0	0

Os valores representam a médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

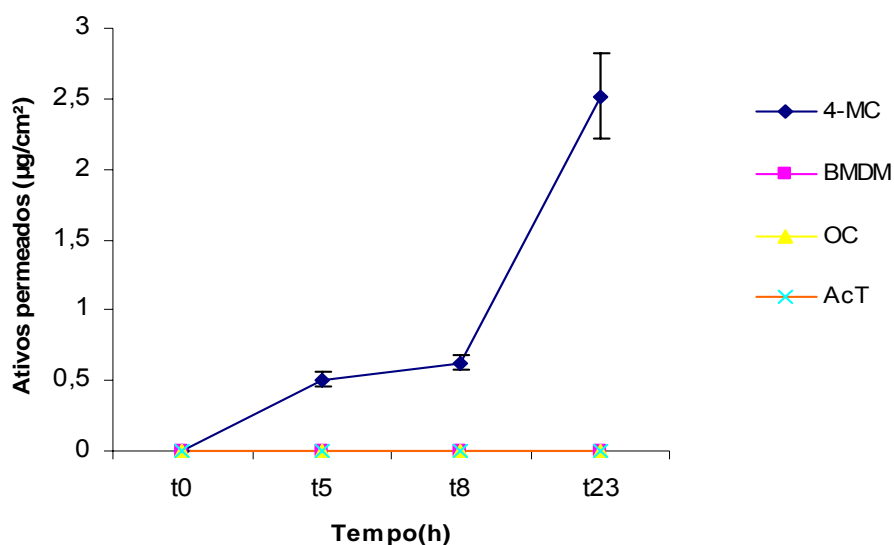


FIGURA 4- PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO

As **Tabelas 7 e 8** apresentam os resultados de retenção da 4-MC, BMDM, OC E AcT, no estrato córneo e na [epiderme sem EC+derme] empregando o gel alcoólico, e as **Figuras 5 e 6** ilustram a retenção cutânea dos mesmos.

TABELA 7. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (µg/cm²)

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Estrato córneo (µg/cm²)	72,284 (±10,1)	35,024 (±3,2)	57,122 (±6,17)	273,08 (±20,18)
[Epiderme sem EC+derme] (µg/cm²)	25,42 (±4,2)	10,006 (±1,07)	9,474 (±0,44)	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

TABELA 8. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (%)

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Estrato córneo (%)	7,208(±0,97)	7,026(±0,63)	12,46(±1,94)	34,754(±2,69)
[Epiderme sem EC+ derme](%)	2,53(±0,45)	2,004(±0,23)	2,028(±0,19)	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.



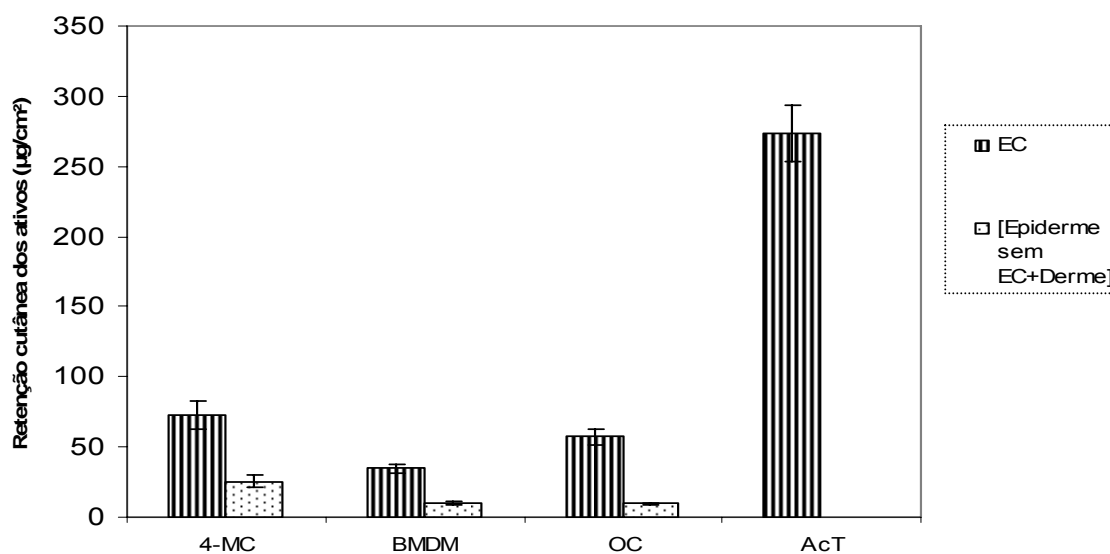


FIGURA 5 - RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (µg/cm²).

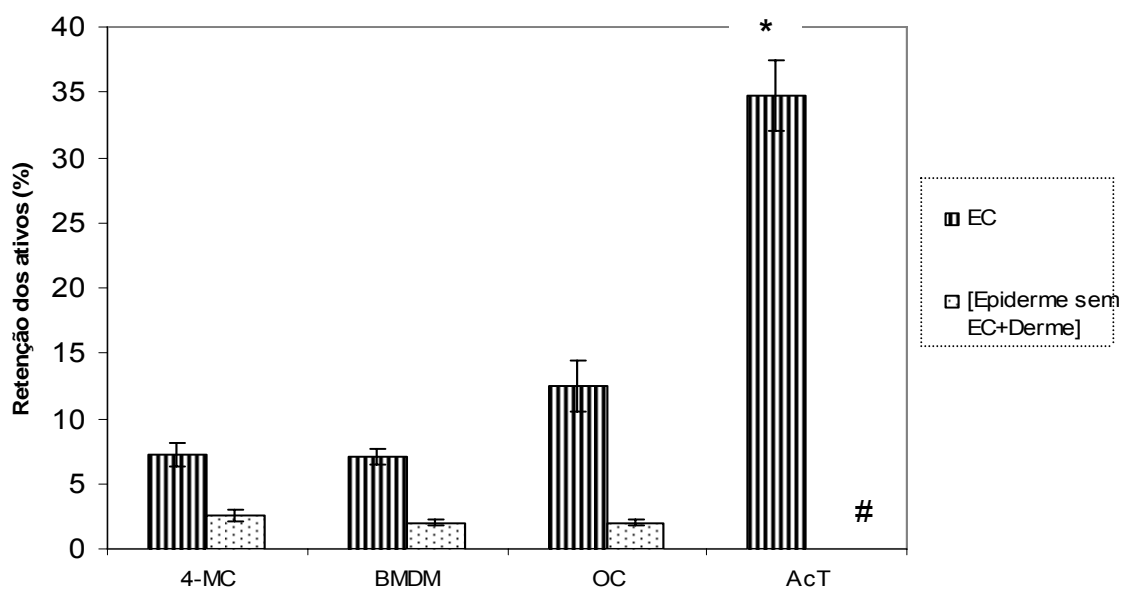


FIGURA 6- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO GEL ALCOÓLICO (%)

\*  $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC do EC

#  $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC da [Epiderme sem EC+derme]

A **Tabela 9** apresenta os resultados da 4-MC, BMDM, OC e AcT, retidos sob a superfície cutânea e presentes no bastão utilizado para espalhar o produto sobre a pele empregando o gel alcoólico.

TABELA 9. ATIVOS RETIDOS SOB SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA.

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Lavagem (%)	74,98(±4,06)	75,45(±2,5)	75,834(±5,31)	53,297(±3,34)*
Bastão (%)	29,85(±4,08)	29,524(±5,84)	30,564(±5,6)	11,7(±2,87)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

\*p<0,05 para contraste com 4-MC, BMDM e OC

A **Tabela 10** apresenta os resultados de permeação cutânea *in vitro* da 4-MC, BMDM, OC e AcT, empregando a emulsão o/a, e a **Figura 7** ilustra seus perfis de permeação cutânea *in vitro* neste veículo.

TABELA 10. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A.

Tempo de coleta(h)	4-MC ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	BMDM ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	OC ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	AcT( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
T0h	0	0	0	0
T5h	0	0	0	0
T8h	0	0	0	0
T23h	1,96725(±0,576)	0	0	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a quatro determinações.

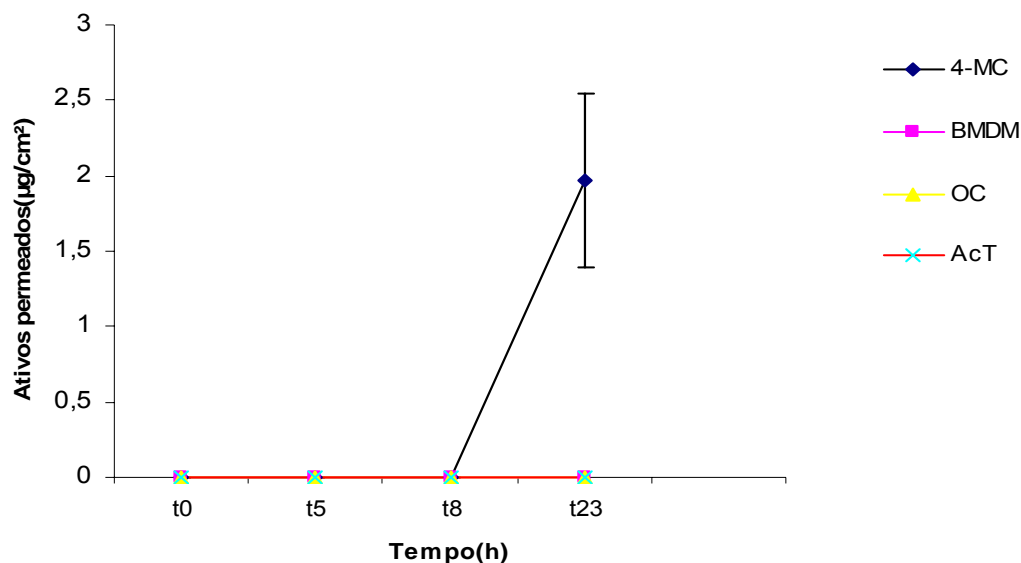


FIGURA 7- PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A

A **Tabela 11 e Tabela 12** apresentam os resultados de retenção cutânea da 4-MC, BMDM, OC e AcT, no estrato córneo e na [epiderme sem EC+derme] empregando a emulsão o/a, e a **Figura 8 e 9** ilustram seus perfis de retenção cutânea neste veículo.

TABELA 11. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Estrato córneo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	35,1625 ( $\pm 5,83$ )	23,7625 ( $\pm 4,66$ )	35,1375 ( $\pm 6,57$ )	0
[Epiderme sem EC+derme] ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	22,737 ( $\pm 4,03$ )	0	10,227 ( $\pm 0,646$ )	258,57 ( $\pm 28,12$ )

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a quatro determinações.

TABELA 12. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A (%)

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Estrato córneo (%)	4,522( $\pm$ 0,72)	6,395( $\pm$ 1,18)	8,045( $\pm$ 1,45)	0
[Epiderme sem EC+ derme](%)	2,9225( $\pm$ 0,5)	0	2,34( $\pm$ 0,12)	40,246( $\pm$ 4,82)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a quatro determinações.

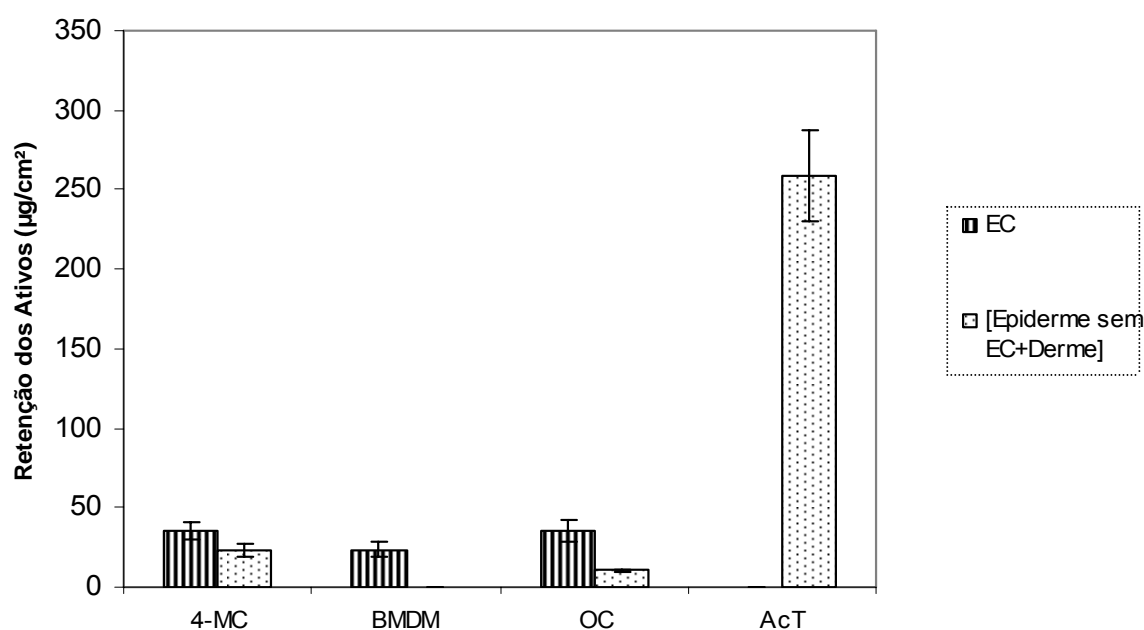


FIGURA 8-.RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERME SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

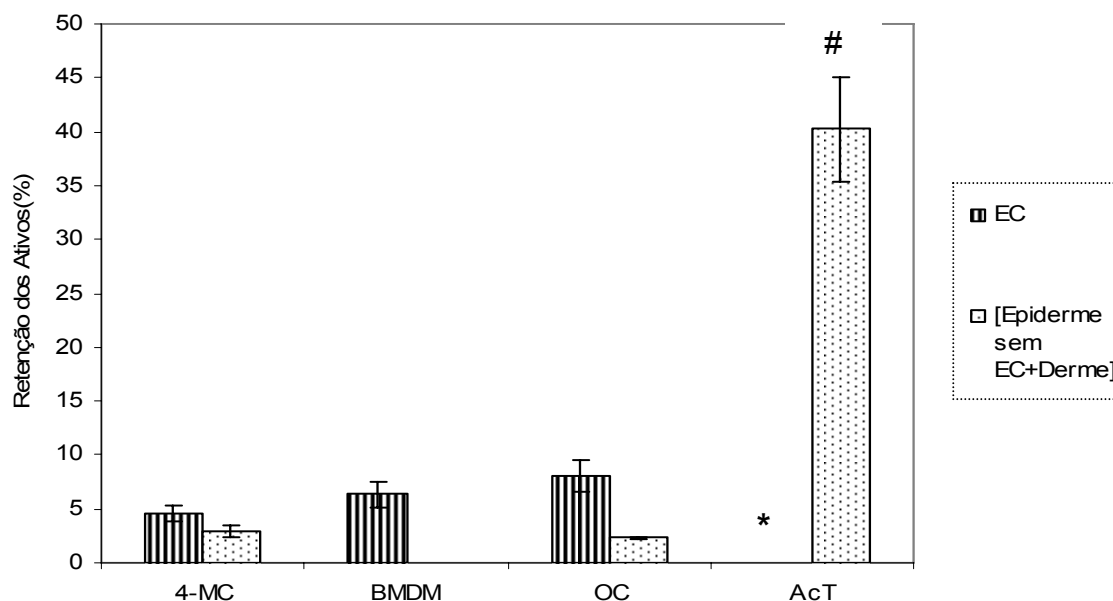


FIGURA 9- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERME SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NA EMULSÃO O/A (%)

\* $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC do EC

# $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC da [Epiderme sem EC+derme]

A **Tabela 13** apresenta os resultados da 4-MC, BMDM, OC e AcT retidos sob a superfície cutânea e presentes no bastão utilizado para espalhar o produto sobre a pele empregando a emulsão o/a.

TABELA 13. ATIVOS RETIDOS SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA.

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Lavagem (%)	77,125(±6,19)	84,8775(±2,93)	75,045(±7,1)	47,432(±3,14)*
Bastão (%)	27,8125(±4,36)	28,55(±4,78)	26,90(±4,88)	19,425(±5,15)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a quatro determinações.

\*  $p < 0,05$  para contraste com 4-MC, BMDM e OC.

A **Tabela 14** apresenta os resultados de permeação cutânea *in vitro* da 4-MC, BMDM, OC e AcT, no fluido alcoólico.

TABELA 14. PERMEAÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO.

<i>Tempo de coleta(h)</i>	<i>4-MC (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</i>	<i>BMDM (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</i>	<i>OC(<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</i>	<i>AcTI (<math>\mu\text{g}/\text{cm}^2</math>)</i>
T0h	0	0	0	0
T5h	0	0	0	0
T8h	0	0	0	0
T23h	0	0	0	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

As **Tabelas 15 e 16** apresentam os resultados de retenção cutânea da 4-MC, BMDM, OC e AcT, no estrato córneo e na [epiderme sem EC+derme] no fluido alcoólico, e as **Figuras 10 e 11** ilustram seus perfis de retenção cutânea.

TABELA 15. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

<i>Ativo</i>	<i>4-MC</i>	<i>BMDM</i>	<i>OC</i>	<i>AcT</i>
Estrato córneo ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	29,836 ( $\pm 3,35$ )	17,026 ( $\pm 1,72$ )	18,584 ( $\pm 2,69$ )	98,112 ( $\pm 10,48$ )
[Epiderme sem EC + derme] ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	6,698 ( $\pm 0,11$ )	0,748 ( $\pm 0,09$ )	1,7138 ( $\pm 0,35$ )	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

TABELA 16. RETENÇÃO CUTÂNEA DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO (%)

<i>Ativo</i>	<i>4-MC</i>	<i>BMDM</i>	<i>OC</i>	<i>AcT</i>
Estrato córneo (%)	5,158( $\pm 0,58$ )	5,412( $\pm 0,25$ )	6,196( $\pm 0,91$ )	26,706( $\pm 2,54$ )
[Epiderme sem EC+ Derme](%)	1,152( $\pm 0,02$ )	0,252( $\pm 0,03$ )	0,572( $\pm 0,12$ )	0

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

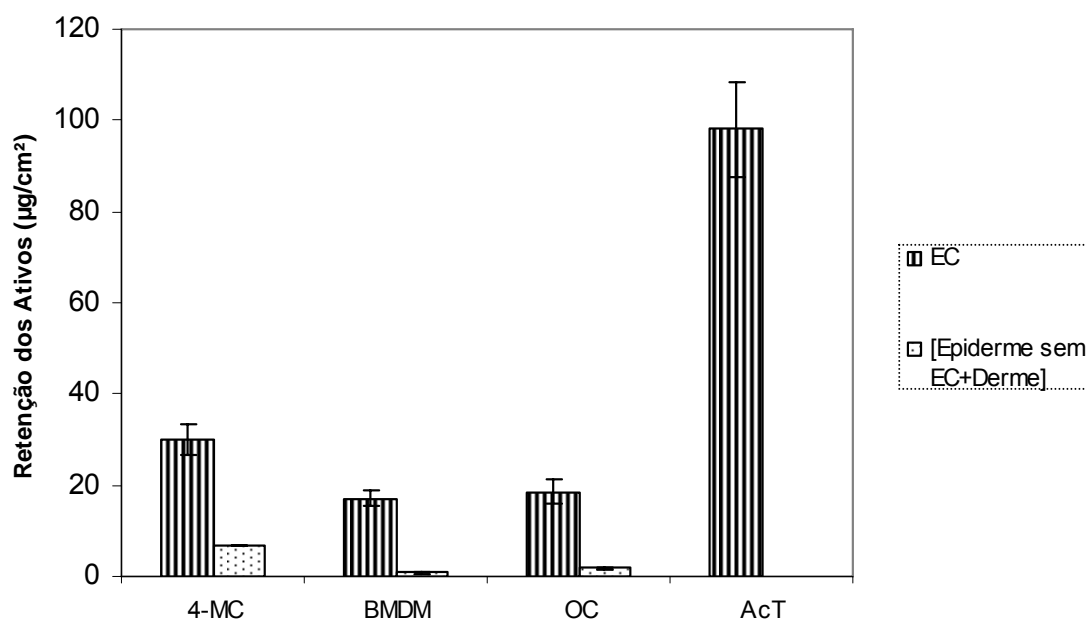


FIGURA 10- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO (µg/cm²)

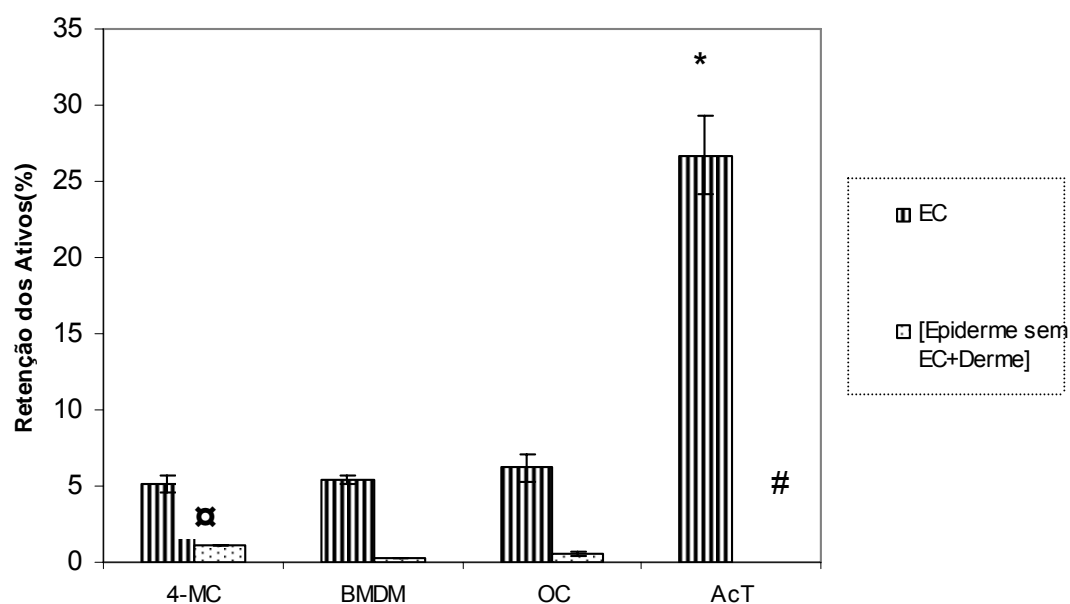


FIGURA 11- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO E NA [EPIDERMES SEM EC+DERME] DOS ATIVOS NO FLUIDO ALCOÓLICO (%)

\*  $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC do EC

#  $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC, BMDM e OC da [epiderme sem EC+derme]

■  $p < 0,05$  para contraste com o BMDM, OC e AcT da [epiderme sem EC+derme]

A **Tabela 17** apresenta os resultados da 4-MC, BMDM, OC e AcT, retidos sob a superfície cutânea e presentes no bastão utilizado para espalhar o produto sobre a pele empregando o fluido alcoólico.

TABELA 17. ATIVOS RETIDOS SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA E QUE RESTARAM NO BASTÃO DE APLICAÇÃO DA AMOSTRA.

Ativo	4-MC	BMDM	OC	AcT
Lavagem (%)	80,1716( $\pm 1,55$ )	81,1654( $\pm 1,4$ )	79,13( $\pm 1,75$ )	66,438( $\pm 0,95$ )*
Bastão (%)	9,874( $\pm 0,69$ )	9,27( $\pm 0,4$ )	9,816( $\pm 0,69$ )	13,044( $\pm 1,75$ )

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações

\*  $p < 0,05$  para contraste com 4-MC, BMDM e OC.

A **Figura 12** ilustra um perfil comparativo de permeação cutânea em  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  do ativo 4-MC no gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

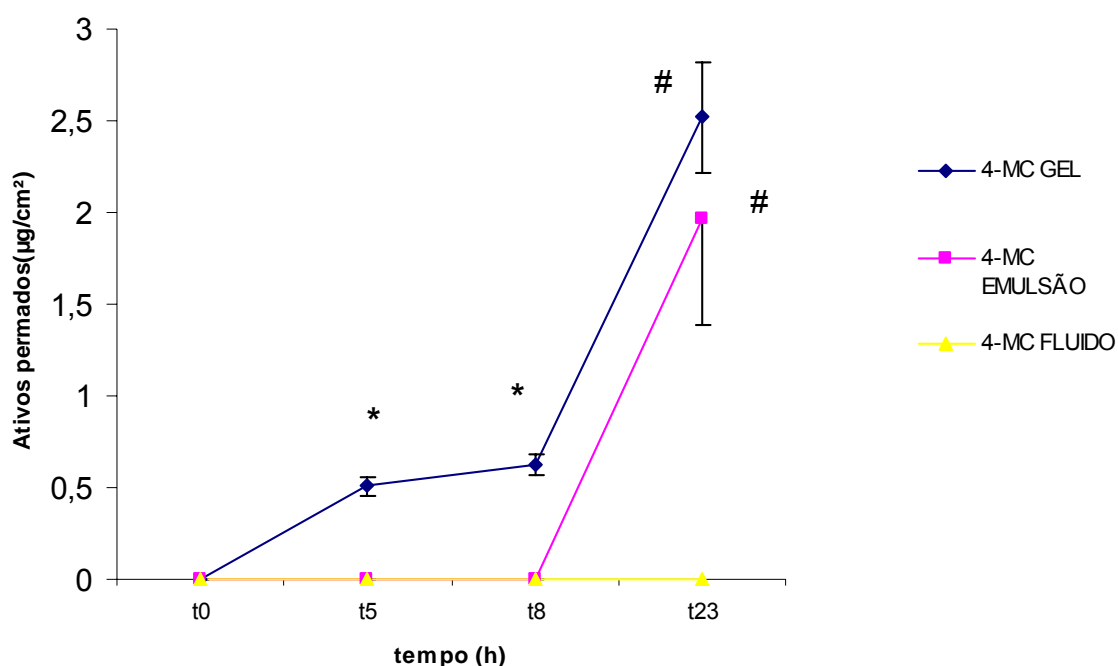


FIGURA 12- PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA 4-MC NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

\*  $p < 0,05$  para contraste com a emulsão o/a e o fluido alcoólico

#  $p < 0,05$  para contraste com o fluido alcoólico



As **Figuras 13, 14, 15 e 16** ilustram um perfil comparativo de retenção cutânea em porcentagem, dos ativos: 4-MC, BMDM, OC e AcT, respectivamente, nos veículos gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

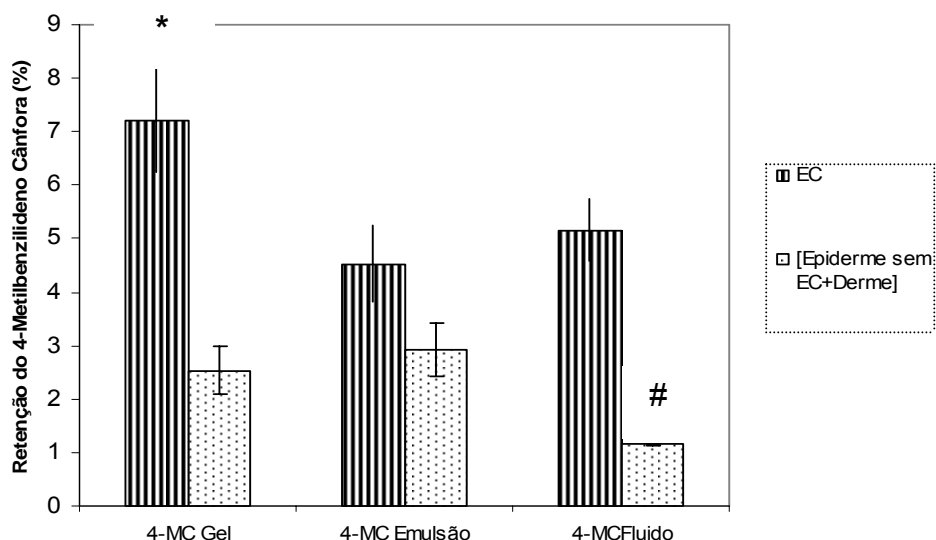


FIGURA 13- RETENÇÃO CUTÂNEA DA 4-MC NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

\* $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC emulsão o/a e fluido alcoólico do EC

# $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC gel e emulsão da [epiderme sem EC+Derme]

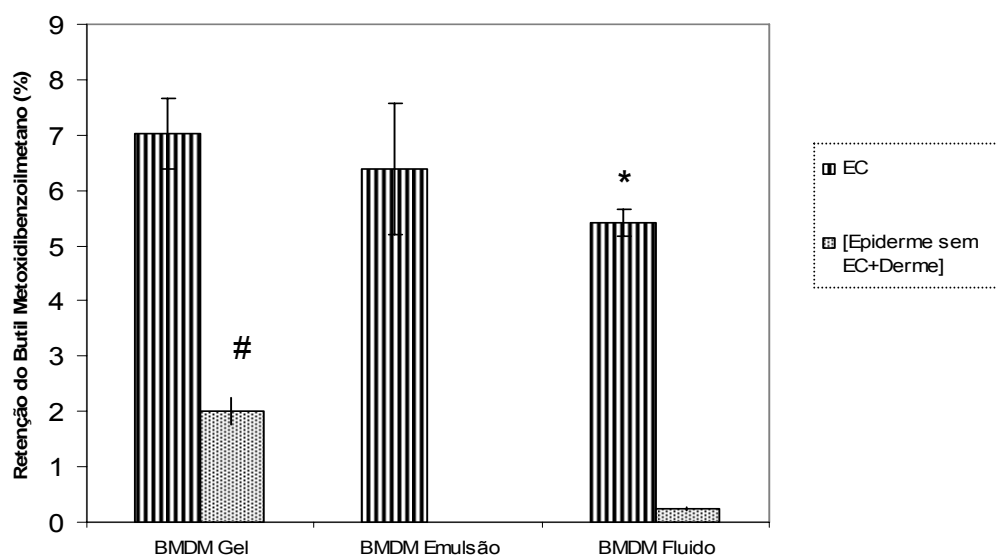


FIGURA 14- RETENÇÃO CUTÂNEA DO BMDM NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

\* $p < 0,05$  para contraste com o BMDM gel e emulsão do EC

# $p < 0,05$  para contraste com o BMDM emulsão e fluido da [epiderme sem EC+Derme]

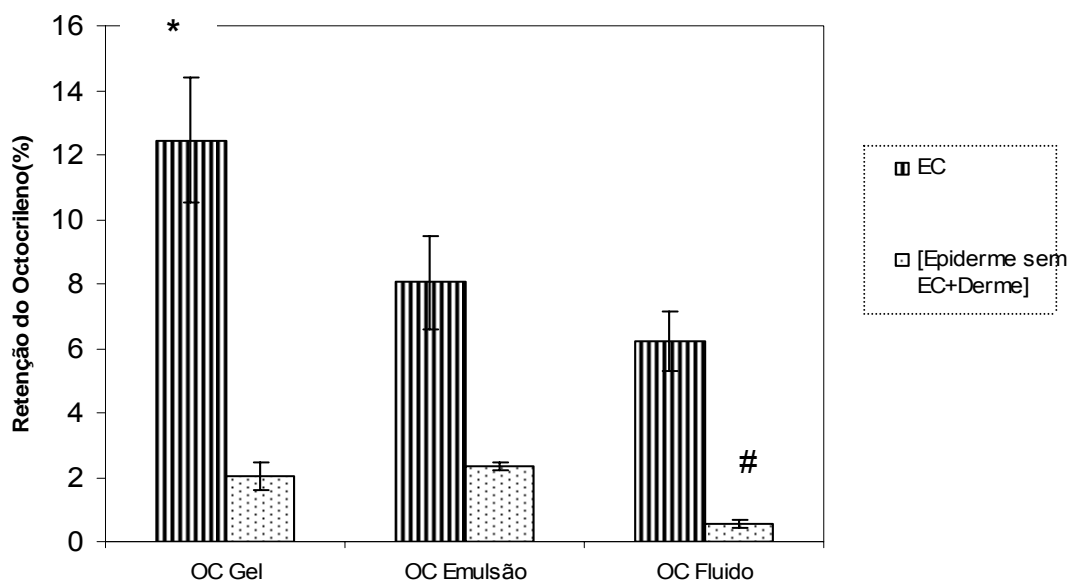


FIGURA 15-.RETENÇÃO CUTÂNEA DO OC NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

\*  $p < 0,05$  para contraste com o OC emulsão o/a e fluido alcoólico do EC

#  $p < 0,05$  para contraste com o OC emulsão o/a e gel alcoólico da [epiderme sem EC+derme]

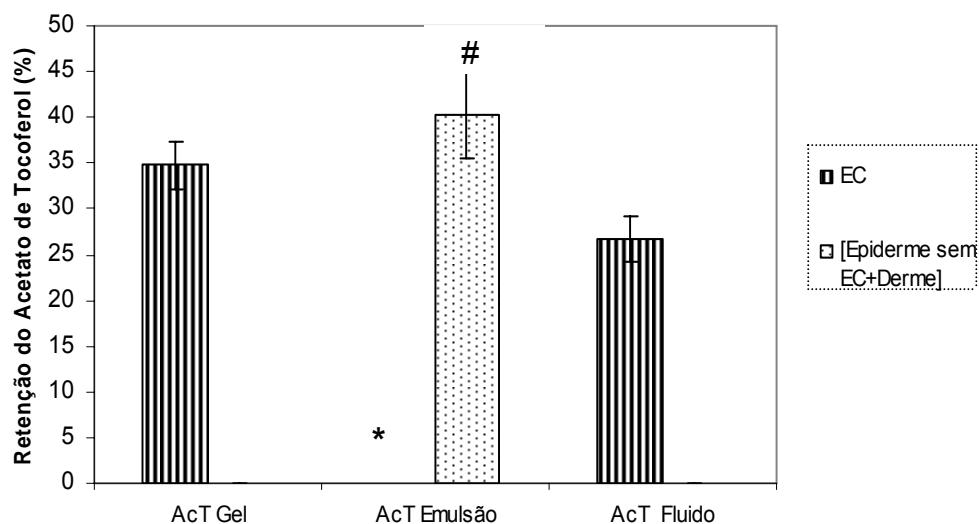


FIGURA 16- RETENÇÃO CUTÂNEA DO AcT NOS VEÍCULOS: GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

\*  $p < 0,05$  para contraste com o AcT gel alcoólico e fluido alcoólico do EC

#  $p < 0,05$  para contraste com o AcT gel e fluido da [epiderme sem EC+derme]

TABELA 18. VALORES COMPARATIVOS DO AcT RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

	<i>AcT (%)</i>
Gel alcoólico	53,297(±3,34) *
Emulsão o/a	47,432(±3,14) *
Fluido alcoólico	66,438(±0,95)

\*p< 0,05 para contraste com AcT fluido alcoólico

TABELA 19. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DA 4-MC RETIDA SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

	<i>4-MC (%)</i>
Gel alcoólico	74,98(± 4,06)
Emulsão o/a	77,125(±6,19)
Fluido alcoólico	80,1716(±1,55)

p>0,05

TABELA 20. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DO BMDM RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

	<i>BMDM (%)</i>
Gel alcoólico	75,45 (± 2,50) *
Emulsão o/a	84,87(±2,93)
Fluido alcoólico	81,16(±1,4)

\* p<0,05 para contraste com BMDM emulsão o/a e fluido alcoólico

TABELA 21. VALORES COMPARATIVOS OBTIDOS DO OC RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA, NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO

	<i>OC (%)</i>
Gel alcoólico	75,834 (± 5,31)
Emulsão o/a	75,045(±7,1)
Fluido alcoólico	79,13(±1,76)

p >0,05

## 5.4. ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VIVO*

### 5.4.1 Avaliação da perda de água transepidermal (TEWL).

TABELA 22. VALORES OBTIDOS DA MEDIDA DE PERDA TRANSEPIDERMAL DE ÁGUA.

Voluntários	Antebraço direito (g/m <sup>2</sup> h)	Antebraço esquerdo (g/m <sup>2</sup> h)
1	7,8	7,2
2	6,4	7,0
3	6,7	6,2
4	7,2	7,6
5	8,1	7,9

5.4.2. Permeação cutânea *in vivo* por técnica de *tape stripping* empregando os ativos incorporados no gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico.

A **Tabela 23** apresenta os resultados do experimento *in vivo* de retenção cutânea no estrato córneo do AcT nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico em 30 minutos e 4 horas. A **Figura 17** ilustra um perfil comparativo de retenção cutânea do AcT nos três veículos.

TABELA 23. AcT NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS E 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

	AcT 30' (%)	AcT 4h (%)
Gel alcoólico	59,59(±6,64)	32,89(±2,48)
Emulsão o/a	32,3(±4,66)	12,71(±2,24)
Fluido alcoólico	38,59(±4,75)	29,93(±2,07)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

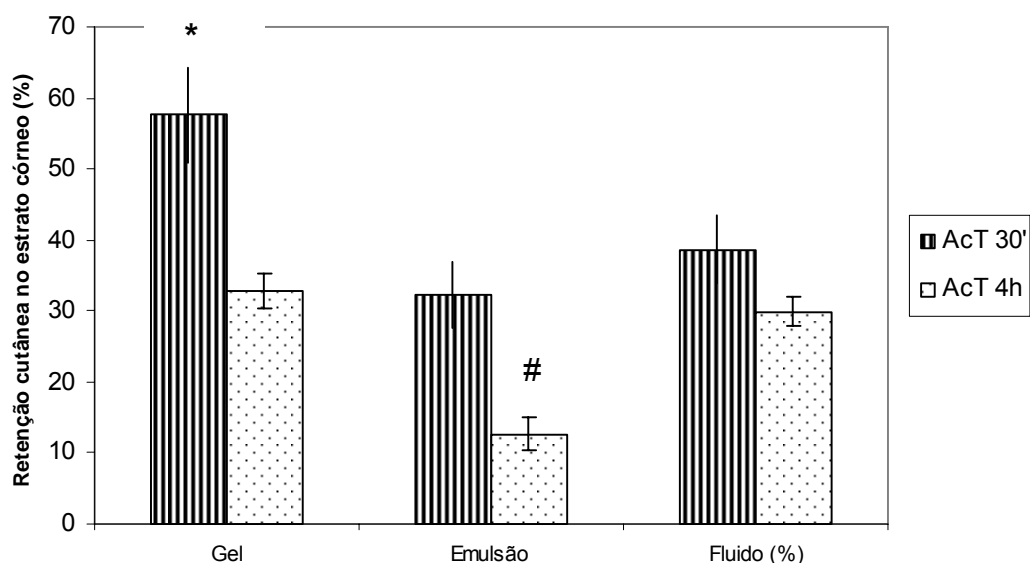


FIGURA 17- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DO AcT EM 30' E 4h.

\* $p < 0,05$  para contraste com o AcT 30' emulsão e fluido alcoólico

#  $p < 0,05$  para contraste com o AcT 4h gel e fluido alcoólico

A **Tabela 24** apresenta os resultados obtidos da retenção do AcT sob a superfície cutânea na remoção feita pelos dois primeiros adesivos como descrito no item **4.2.7.2**

TABELA 24. AcT RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA

	AcT 30' (%)	AcT 4h (%)
Gel alcoólico	30,59(± 5,14) *	28,11(±4,44)
Emulsão o/a	41,95(±5,70)	30,89(±5,71)
Fluido alcoólico	41,33(± 4,59)	35,95(±3,89)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

\* $p < 0,05$  para contraste com o AcT 30' emulsão o/a e fluido alcoólico

A **Tabela 25** apresenta os resultados do experimento *in vivo* de retenção cutânea no estrato córneo da 4-MC nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico em 30 minutos e 4 horas. A **Figura 18** ilustra um perfil comparativo de retenção cutânea da 4-metilbenzilideno cânfora nos três veículos.

TABELA 25. 4-MC NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS E 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

	4-MC 30' (%)	4-MC 4h (%)
Gel alcoólico	54,3(±4,06)	13,33(±2,01)
Emulsão o/a	30,97 (±5,96)	25,92(±2,75)
Fluido alcoólico	28,42(±5,63)	26,34(±3,27)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

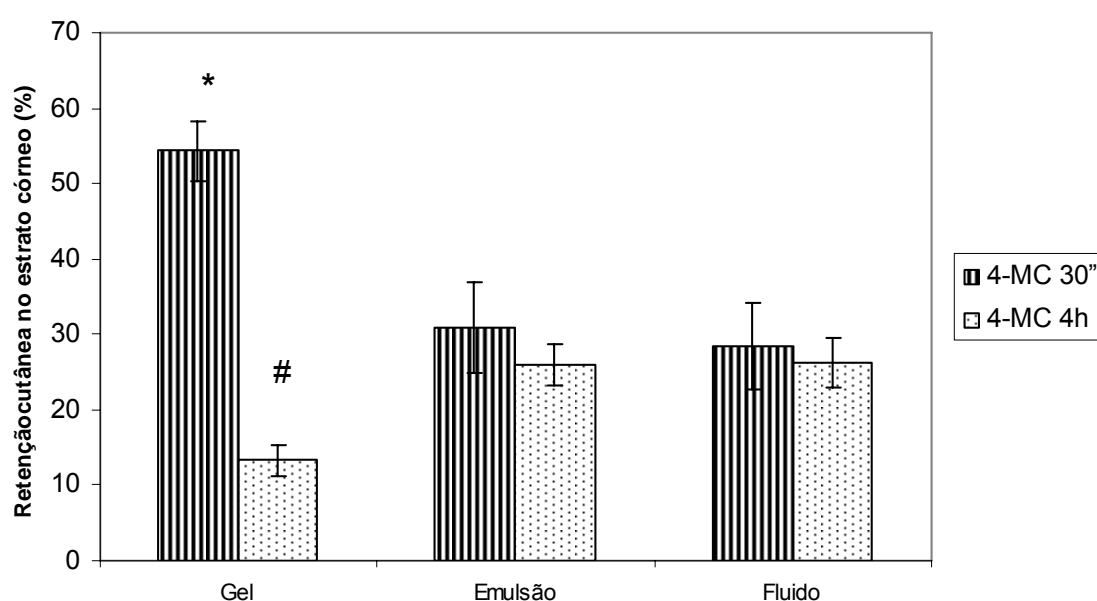


FIGURA 18-RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DA 4-MC EM 30' E 4h.

\* $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC 30' emulsão o/a e fluido alcoólico

#  $p < 0,05$  para contraste com a 4-MC 4h emulsão o/a e fluido alcoólico

A **Tabela 26** apresenta os resultados obtidos da retenção da 4-MC, sob a superfície cutânea na remoção feita pelos dois primeiros adesivos como descrito no item **4.2.7.2**.

TABELA 26. 4-MC RETIDA SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA

	4-MC 30' (%)	4-MC 4h (%)
Gel alcoólico	32,54(± 3,45) *	29,12(±3,19) #
Emulsão o/a	45,77(± 4,39)	39,56(±3,46)
Fluido alcoólico	46,25(± 4,67)	40,14(±4,53)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

\*p<0,05 para contraste com a 4-MC 30' emulsão e fluido alcoólico

#p<0,05 para contraste com a 4-MC 4h emulsão e fluido alcoólico

A **Tabela 27** apresenta os resultados do experimento *in vivo* de retenção cutânea no estrato córneo do BMDM nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico em 30 minutos e 4 horas. A **Figura 19** ilustra um perfil comparativo de retenção cutânea do BMDM nos três veículos

TABELA 27. BMDM NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS E 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

	BMDM 30' (%)	BMDM 4h (%)
Gel alcoólico	50,49(±5,04)	14,41(±2,34)
Emulsão o/a	44,44(±5,52)	32,15(±2,05)
Fluido alcoólico	44,3(±4,4)	30,31(±2,74)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

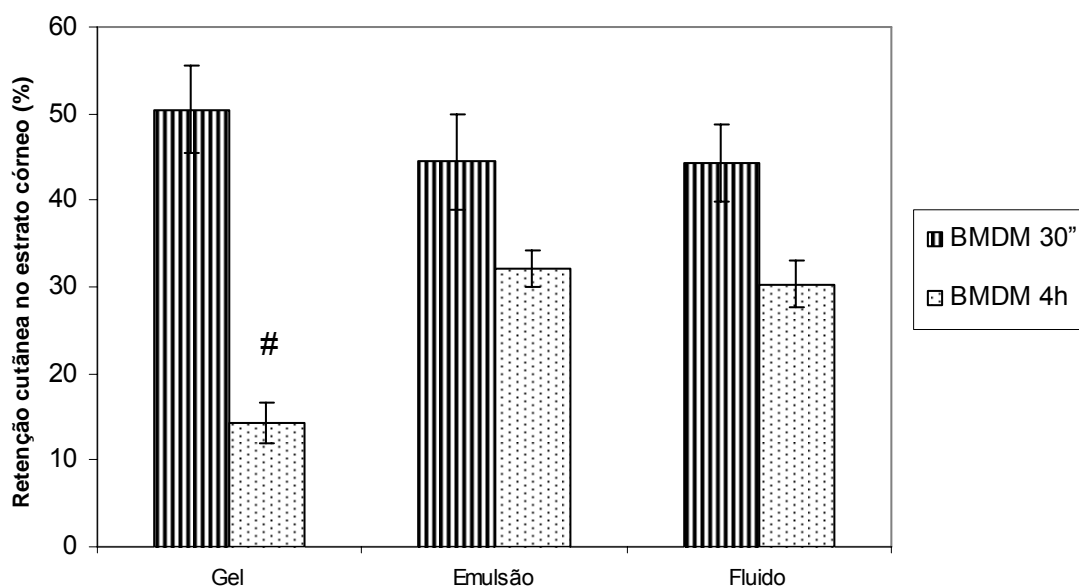


FIGURA 19- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DO BMDM EM 30' E 4h.

#  $p < 0,05$  para contraste com o BMDM 4h emulsão e fluido

A **Tabela 28** apresenta os resultados obtidos da retenção do BMDM sob a superfície cutânea na remoção feita pelos dois primeiros adesivos como descrito no item 4.2.7.2

TABELA 28. BMDM RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA

	BMDM 30" (%)	BMDM 4h (%)
Gel alcoólico	36,88(± 3,78)	28,34(±4,54) #
Emulsão o/a	41,05(± 5,56)	36,18(±4,40)
Fluido alcoólico	42,82(± 5,17)	37,45(±3,84)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

#  $p < 0,05$  para contraste com o BMDM 4h emulsão e fluido

A **Tabela 29** apresenta os resultados do experimento *in vivo* de retenção cutânea no estrato córneo do OC nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico em 30 minutos e 4 horas. A **Figura 20** ilustra um perfil comparativo de retenção cutânea do OC nos três veículos.



TABELA 29. OC NO ESTRATO CÓRNEO EM 30 MINUTOS EM 4h NO GEL ALCOÓLICO, EMULSÃO O/A E FLUIDO ALCOÓLICO.

	OC 30' (%)	OC 4h (%)
Gel alcoólico	63,12(±6)	16,38(±2,4)
Emulsão o/a	48,05(±5,56)	29,63(±4,1)
Fluido alcoólico	41,78(±6,4)	27,18(±2,88)

Os valores representam as médias e os desvios padrões referentes a cinco determinações.

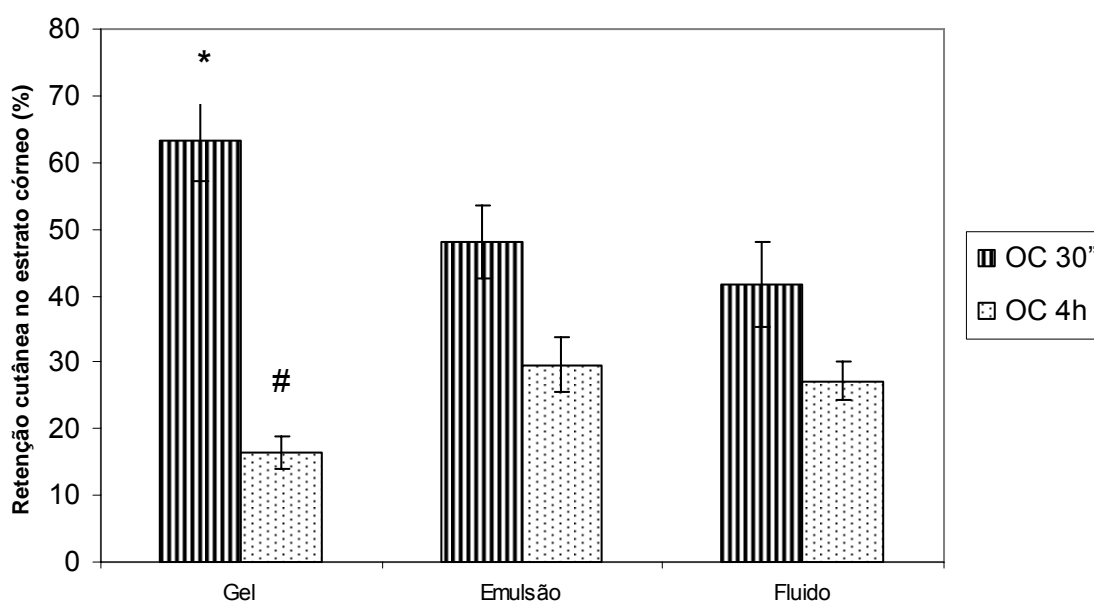


FIGURA 20- RETENÇÃO CUTÂNEA NO ESTRATO CÓRNEO DO OC EM 30' E 4h

\* $p < 0,05$  para contraste com o OC 30' emulsão e fluido

#  $p < 0,05$  para contraste com o OC 4h emulsão e fluido

A **Tabela 30** apresenta os resultados obtidos da retenção do OC sob a superfície cutânea na remoção feita pelos dois primeiros adesivos como descrito no item **4.2.7.2**

TABELA 30. OC RETIDO SOB A SUPERFÍCIE CUTÂNEA.

	OC 30' (%)	OC 4h (%)
Gel alcoólico	27,30(± 3,48) *	22,00(±5,10) #
Emulsão o/a	40,66(± 4,84)	34,22(±4,35)
Fluido alcoólico	42,03(± 4,64)	35,62(±4,78)

Os valores representam as médias e os desvios referentes a cinco determinações.

\* $p < 0,05$  para contraste com OC 30' emulsão o/a e fluido alcoólico

# $p < 0,05$  para contraste com OC 4h emulsão o/a e fluido alcoólico

### 5.5. CURVAS DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS ATIVOS: 4-METILBENZILIDENO CÂNFORA, BUTIL METOXIDIBENZOILMETANO E OCTOCRILENO.

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram, respectivamente, as curvas de calibração obtidas para os ativos: 4-MC, BMDM e OC.

A curva de calibração para 4-MC apresenta 21 pontos com concentração variando de 0,003188 mg/ml a 0,1333mg/ml. O método analítico desenvolvido apresentou coeficiente de correlação  $r=0,99942$  (Figura 21).

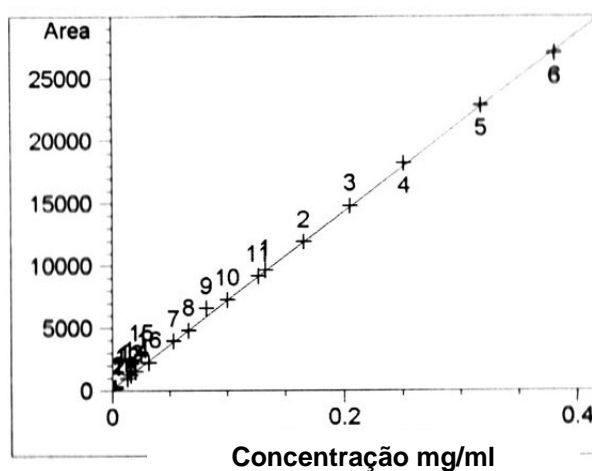


FIGURA 21-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO 4-MC POR CLAE

A curva de calibração para o BMDM apresenta 21 pontos com concentração variando de 0,0032104 mg/ml a 0,125814 mg/ml. O método analítico desenvolvido apresentou coeficiente de correlação  $r=0,99945$  (**Figura 22**)

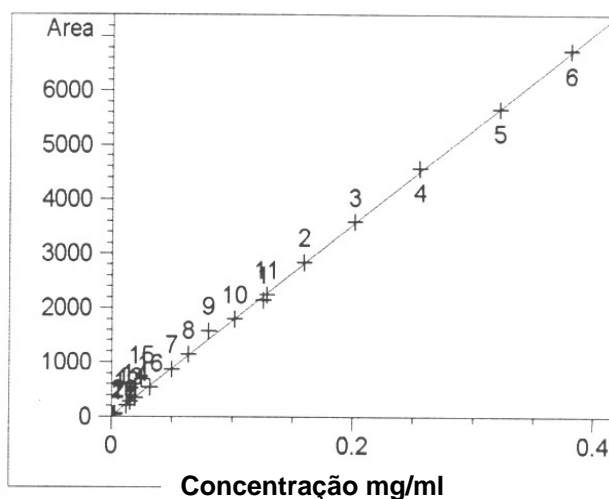


FIGURA 22-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO BMDM POR CLAE

A curva de calibração para o OC apresentou 21 pontos com concentração variando de 0,003631 mg/ml a 0,1354 mg/ml. O método analítico desenvolvido para o OC apresentou coeficiente de correlação  $r=0,99885$  (**Figura 23**)

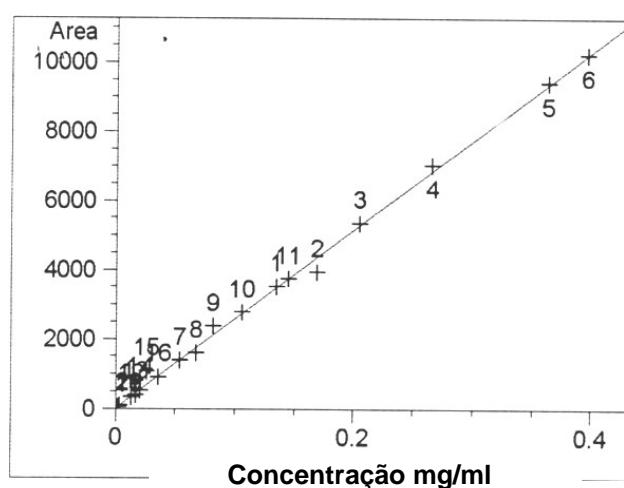


FIGURA 23- REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO OC POR CLAE

A determinação da 4-MC, BMDM e OC foram realizadas conforme o método descrito no item 4.2.8. A **Figura 24** mostra um cromatograma referente a análise dos padrões acima citados nas condições empregadas

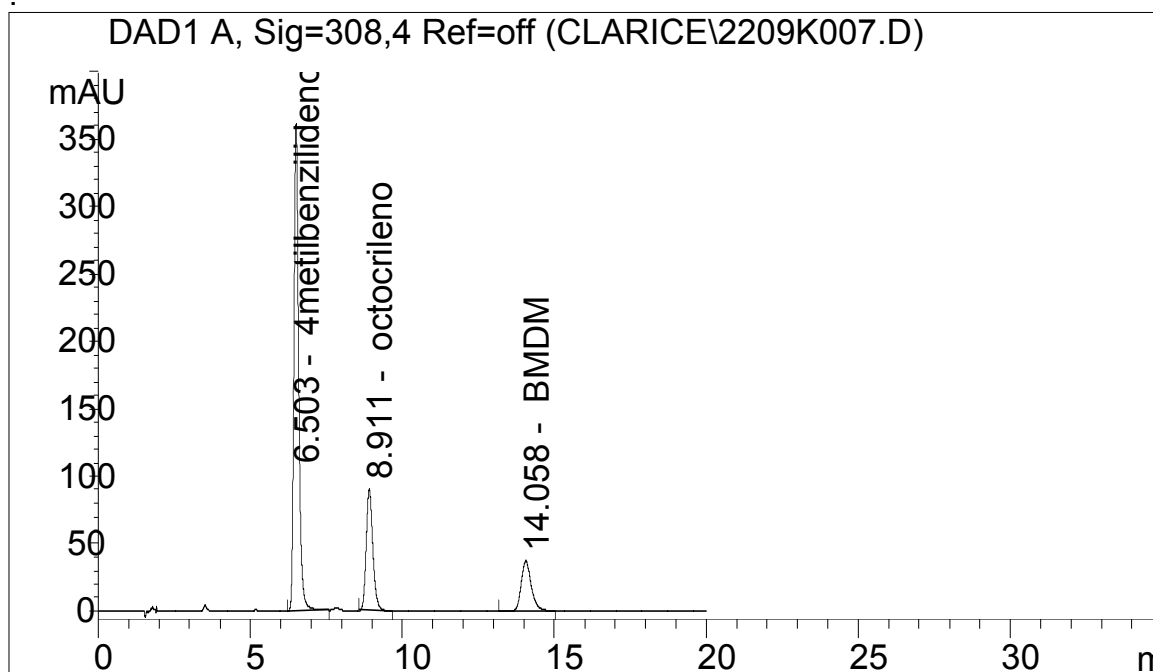


FIGURA 24-CROMATOGRAMA ILUSTRANDO A ANÁLISE DO 4-MC, OC E BMDM

Condições cromatográficas: Coluna de fase reversa  $C_{18}$  (Beckman Coulter-ODS  $5\mu$ -4,6mmx25cm); Fase móvel: metanol/água/ácido acético (850:150:5), num fluxo de 1,5ml/min; detecção em 388nm. Tempo de retenção do 4-MC-6,503min. Tempo de retenção do OC-8,911min. Tempo de retenção da BMDM-14,058min. m AU: unidade de absorbância por escala total

As **Figuras 25, 26 e 27** demonstram cromatogramas referente à análise da 4-MC, BMDM e OC nos veículos:gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico, respectivamente.

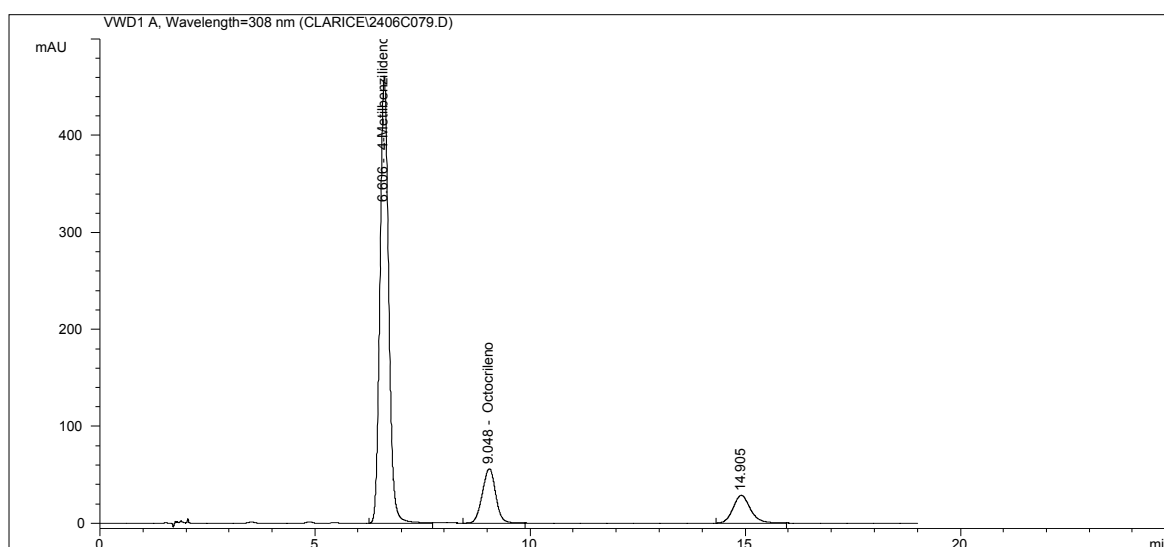


FIGURA 25- CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NO GEL ALCOÓLICO

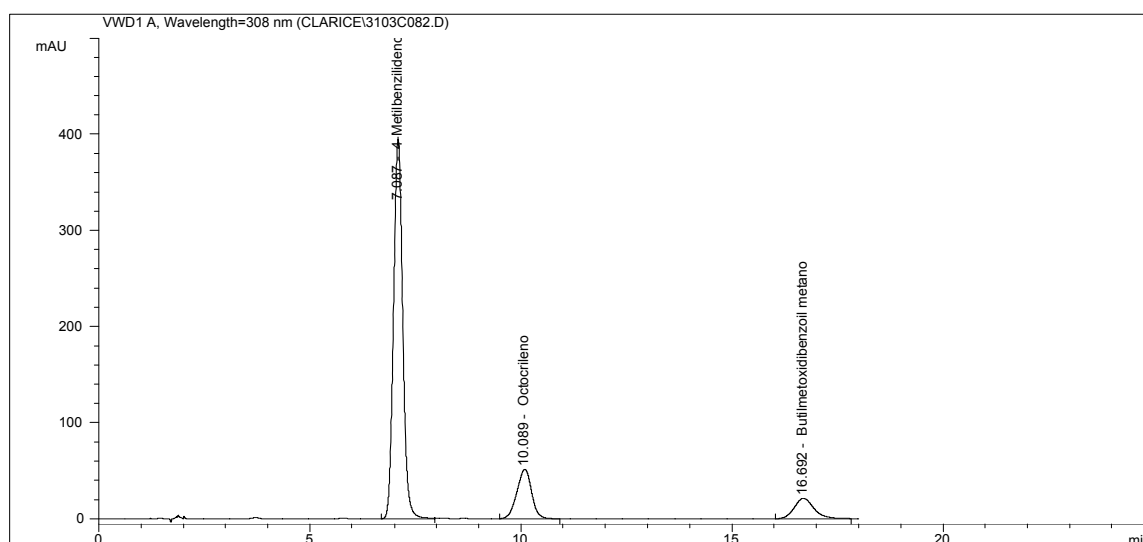


FIGURA 26- CROMATOGRAMA REFERENTE À ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NA EMULSÃO O/A

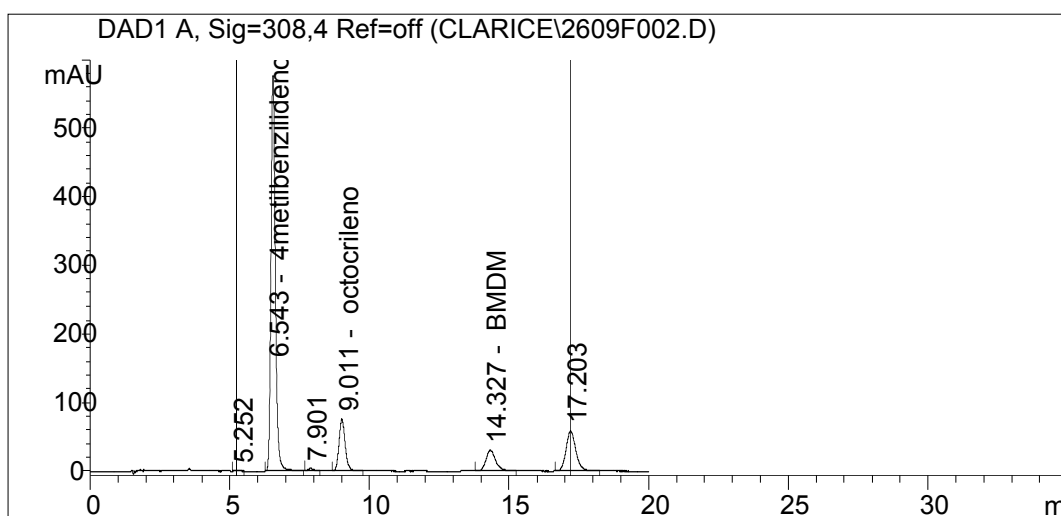


FIGURA 27- CROMATOGRAMA REFERENTE A ANÁLISE DA 4-MC, OC E BMDM NO FLUIDO ALCOÓLICO

#### 5.6. CURVA DE CALIBRAÇÃO E CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DO ATIVO: ACETATO DE TOCOFEROL

A curva de calibração do AcT apresenta 15 pontos com concentração variando de 0,03037 mg/ml a 0,1288mg/ml. O método analítico desenvolvido apresentou coeficiente de correlação  $r=0,99934$  (**Figura 28**)

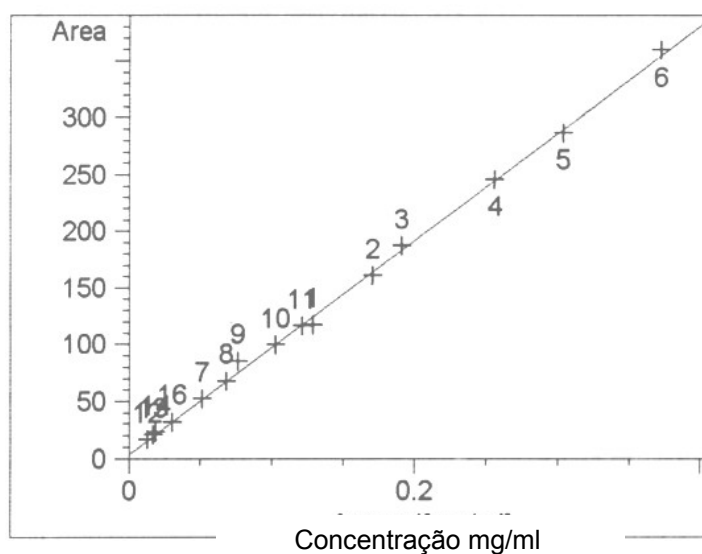


FIGURA 28-REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO AcT POR CLAE

A determinação do AcT foi realizada conforme o método descrito no item 4.2.9. A **Figura 29** mostra um cromatograma referente a análise do AcT padrão nas condições empregadas.

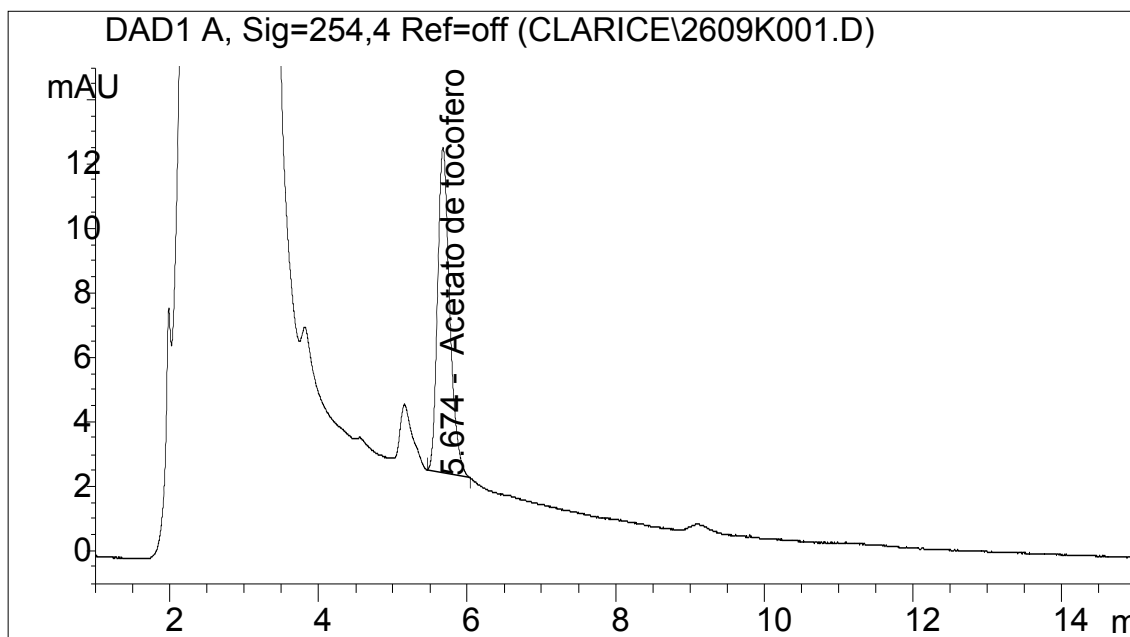


FIGURA 29- CROMATOGRAMA ILUSTRANDO A ANÁLISE DO AcT.

Condições cromatográficas: Coluna de fase reversa  $C_{18}$  (Beckman Coulter-ODS  $5\mu$ -4,6mmx25cm); Fase móvel metanol/isopropanol/ácido fosfórico (500:500:5), num fluxo de 1,0ml/min; detecção em 254nm. Tempo de retenção do AcT-5,674 min. m AU: unidade de absorbância por escala total.

As **Figuras 30, 31 e 32** demonstram os cromatogramas referentes a análise do AcT nos veículos: gel alcoólico, emulsão o/a e fluido alcoólico, respectivamente.

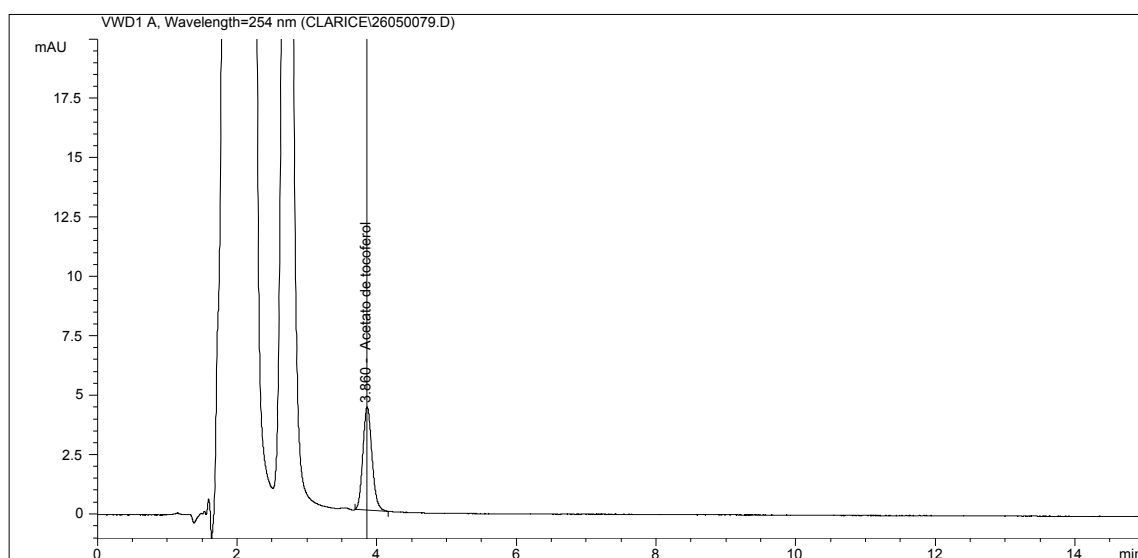


FIGURA 30-CROMATOGRAMA REFERENTE AO AcT NO GEL ALCOÓLICO.

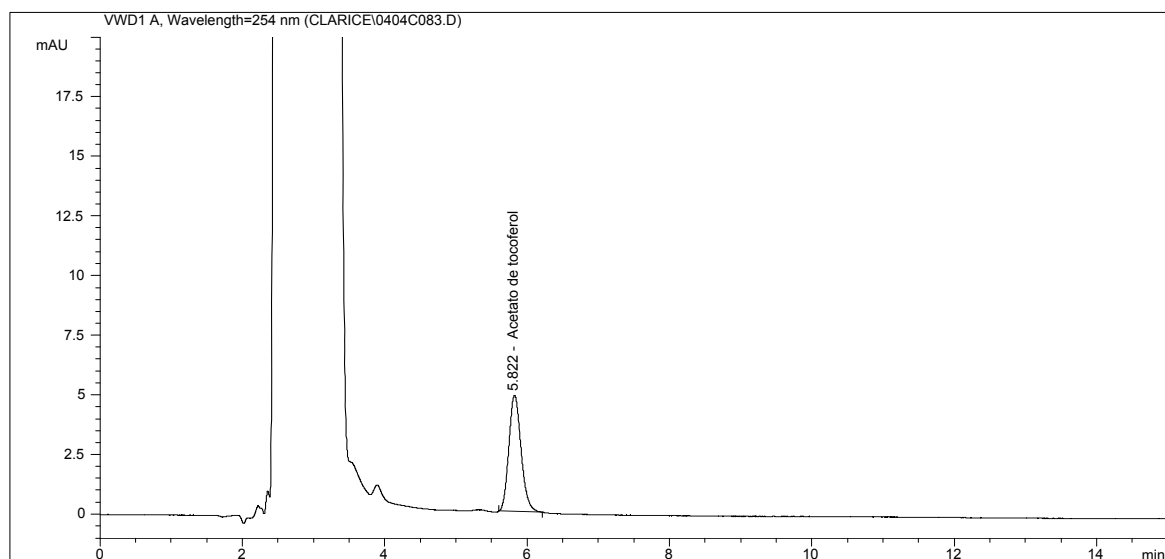


FIGURA 31 CROMATOGRAMA REFERENTE AO ACETATO DE TOCOFEROL NA EMULSÃO O/A



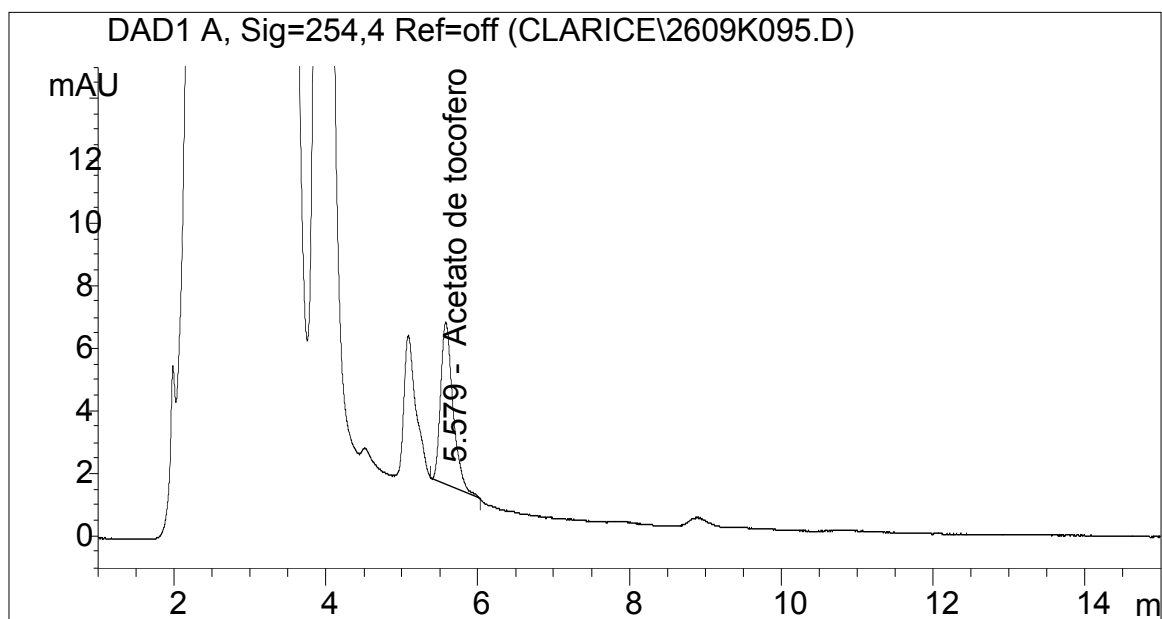


FIGURA 32- CROMATOGRAMA REFERENTE AO ACETATO DE TOCOFEROL NO FLUIDO ALCOÓLICO.



## 6. DISCUSSÃO

As técnicas de permeação cutânea *in vitro* são técnicas comumente empregadas, pois permitem estudar os parâmetros que influenciam desde a liberação do ativo do veículo para superfície cutânea até sua difusão nas camadas da pele, de maneira prática e sem a interferência de fatores biológicos. Além disso, é vantajoso quantificar a penetração de ativos entre os tecidos da pele e a distribuição sistêmica dos mesmos para prover um melhor entendimento do potencial de toxicidade. As metodologias de permeação *in vitro* nos dão um indicativo do que poderá eventualmente ocorrer *in vivo*, sendo uma ótima ferramenta para seleção de formulações, mas justamente por não estarem presente as funções metabólicas normais, os resultados obtidos fornecem apenas um direcionamento.

Obtidos os resultados dos experimentos *in vitro*, parte-se para os experimentos *in vivo*, onde é avaliado o comportamento da permeação do ativo num organismo vivo com todos os efeitos biológicos atuando em conjunto, além de todas as variações presentes nestes. Entre estas variações podem estar: a integridade cutânea, as diferenças de idade, espessura do estrato córneo, a diferença entre os sexos, entre outras. Sempre que se realizam os testes *in vivo*, busca-se minimizar todas estas possíveis variáveis para que o resultado possa ser o mais real possível.

Para a caracterização físico-química dos ativos foram determinados os coeficientes de partilha ( $P_{o/a}$  e  $P_{ec/veículo}$ ) da 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano, octocrileno e acetato de tocoferol bem como a solubilidade dos mesmos.

O coeficiente de partilha dos ativos, foi determinado pelo método de CLAE, descrito no OECD *Guideline* para testes de substâncias químicas, adotado em 30 de março de 1989. As determinações dos coeficientes de partilha o/a do octocrileno e do acetato de tocoferol não foram realizadas por se tratarem de ativos altamente lipofílicos e não apresentarem solubilidade adequada na fase móvel metanol/água(75:25), preconizada por esta metodologia; sendo então propício para estes dois ativos a utilização de cálculos matemáticos, utilizando-se, portanto, SRC's *LogKow-KowWin Program*® para determinação de seus coeficientes de partição o/a.

A hidro e a lipossolubilidade de um ativo são as duas principais características que determinam sua absorção através da pele por difusão. O coeficiente de partilha

mede a quantidade de ativo que se difunde de um veículo líquido, semi-sólido ou sólido para uma fase adjacente com a finalidade de se estabelecer o equilíbrio entre elas (BARRY, 1983).

Os veículos que conseguem aumentar a partilha do ativo no estrato córneo podem levar a um aumento da permeabilidade do mesmo (TOJO *et al.*, 1987). Quando a membrana promove resistência à difusão, ou seja, é o passo limitante no processo de permeação, os valores do coeficiente de partilha são relevantes.

Além disso, o interesse em se determinar o coeficiente de partilha  $P_{o/a}$ , deriva do fato de que esta determinação pode levar a uma predição da atividade de uma substância em um sistema biológico complexo, desde que as limitações do sistema simples sejam levadas em consideração e a atividade do ativo dependa de suas características lipofílicas. (FLORENCE e ATTWOOD, 1988).

Os dados dos coeficientes de partilha indicam que os filtros solares em estudo no presente trabalho apresentaram uma partilha para o óleo numa razão de  $\pm 10^4$  a  $10^7$  vezes maior do que para água, apresentando um  $\log P_{o/a}$  de  $\pm 4,5$  para o butilmetoxidibenzoilmetano, de  $\pm 5,8$  para a 4-metilbenzilideno cânfora e de  $\pm 6,8$  para o octocrileno. Já, o acetato de tocoferol apresentou uma partilha para o óleo numa razão de  $\pm 10^{12}$  vezes maior do que para água, tendo um  $\log P_{o/a}$  de  $\pm 12$ .

Devido aos valores citados acima, a metodologia usualmente utilizada para medidas de coeficiente de partição proposto por WELLS (1988), a qual relaciona o coeficiente de partilha octanol/água, não foi utilizada, pois os ativos não seriam detectados na fase aquosa após a partilha. Deste modo, utilizou-se a metodologia de determinação do coeficiente de partição por CLAE, que é mais indicada para compostos lipofílicos.

Os resultados apresentados na **Tabela 3** indicam que todos os ativos possuem características altamente lipofílicas e portanto uma maior afinidade pela fase oleosa (coluna cromatográfica C18) que pela fase aquosa (fase móvel metanol:água).

Analisando os valores de coeficiente de partilha do estrato córneo com o veículo ( $P_{ec/veículo}$ ) na **Tabela 4**, observa-se que todos os ativos, nos três veículos, partilharam favoravelmente para o estrato córneo. Isto provavelmente ocorre devido a alta lipofilicidade dos ativos e a quantidade de lipídio disponível no estrato córneo para a partilha, além dos mesmos estarem nos veículos solubilizados em um meio

oleoso com afinidade pelo estrato córneo. Isto demonstra que todos os veículos em estudo apresentaram capacidade de liberar os ativos para o estrato córneo.

A solubilidade dos ativos foi verificada através de diferentes proporções de uma mistura etanólica, indicada para substâncias lipofílicas, adicionada de um fluido receptor (solução tampão fosfato pH 7,4) e um agente modificador de solubilidade (polietilenoglicol 20 oleil éter), efetivo para ativos não polares.

Os resultados apresentados na **Tabela 5** mostram que todos os ativos apresentaram solubilidade na solução receptora selecionada para ser utilizada no experimento *in vitro*. De acordo com a tabela da farmacopéia USP XXV, os ativos foram classificados como livremente solúveis (1 a 10 partes do solvente requerida para 1 parte do soluto).

A determinação da solubilidade dos ativos foi feita comparativamente com isopropanol, por ser considerado o solvente, no qual todos os ativos em estudo apresentam solubilidade.

A solubilidade apresentada pelos ativos pode garantir de que os mesmos têm todas as condições necessárias de passar para o fluido receptor no experimento *in vitro* nas células de difusão.

No presente trabalho, avaliou-se a influência de três diferentes veículos cosméticos, sendo eles, um gel alcoólico, uma emulsão não iônica o/a e um fluido alcoólico, na permeação cutânea da associação de filtros solares (4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano e octocrileno) com o acetato de tocoferol. A escolha destes ativos foi programada com o objetivo de ter presente nas formulações filtros UVA e UVB, associados ao acetato de tocoferol, sendo esta associação bastante comum em formulações comerciais. Quanto à escolha dos veículos, deu-se ao fato dos mesmos possuírem características distintas, sendo a emulsão, um veículo micelar com a fase interna óleo e a fase externa água; o gel, um veículo alcoólico polimerizado e o fluido, um veículo alcoólico em solução, também, usual em formulações comerciais. Previamente ao início dos experimentos, todos os veículos passaram por um teste de estabilidade de 90 dias, sendo submetidos a diferentes condições e os mesmos, mantiveram suas características organolépticas e físicas, estabelecidas e determinadas após o preparo.

Discorrendo sobre a seleção das dosagens aplicadas nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, segundo o OECD DRAFT GUIDELINE 428, (2000) doses finitas, são

doses que mimetizam a exposição humana, normalmente entre 1 a 5 mg/cm<sup>2</sup>. Nos experimentos *in vitro*, foi utilizada uma dose infinita ( $\pm 20$ mg/cm<sup>2</sup>), visto que um dos objetivos era verificar a diferença entre os veículos e a quantidade não seria um fator limitante para a permeação dos ativos na pele, além de que, doses menores poderiam impactar nos limites de detecção e quantificação nos ensaios analíticos. Já, no experimento *in vivo*, a dose utilizada foi finita ( $\pm 4$ mg/cm<sup>2</sup>), pois neste, apenas a concentração de ativos removidos do estrato córneo foi doseada, não havendo portanto, problemas nos limites de detecção e quantificação. A dose utilizada foi maior que a recomendada pelo MÉTODO INTERNACIONAL DE DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR, (2003) que preconiza uma 2mg/cm<sup>2</sup>. Optou-se por usar uma dose maior, visto que segundo HAYDEN *et al.*, (1997), existe a recomendação de reaplicação dos filtros solares freqüentemente, portanto, ao longo do dia a quantidade utilizada na prática excederá 2mg/cm<sup>2</sup>.

Nos estudos *in vitro* de permeação cutânea, observou-se primeiramente que o único ativo encontrado na SR do experimento com o gel alcoólico e a emulsão o/a foi a 4-MC, sendo que no experimento com o fluido alcoólico, nenhum dos ativos em estudo foram encontrados na SR. Observando a **Figura 12**, verifica-se que no gel alcoólico, a partir de 5 horas de experimento o ativo foi detectado, aumentando a sua concentração nos tempos subseqüentes (8 horas e 23 horas).

Em 5 e 8 horas, pode-se afirmar que o comportamento do gel alcoólico é diferente dos demais veículos ( $p < 0,05$ ). Em 23 horas de experimento, não há diferença estatística entre o gel alcoólico e a emulsão o/a, mas ambos diferem do comportamento do fluido alcoólico, onde nenhum dos ativos foi encontrado na SR.

Apesar de não se desejar a presença de filtros solares na SR, em 23 horas, a quantidade de 4-MC detectada tanto na SR do experimento com gel alcoólico como com a emulsão o/a, foi relativamente baixa, sendo de aproximadamente 0,5% ou 2µg/cm<sup>2</sup> (**Figura 12**).

Pelo fato de todos os ativos serem extremamente lipofílicos, como já descrito pelos seus coeficientes de partição, o esperado seria que nenhum dos filtros solares fosse detectado na SR. Como descreve HADGRAFT (1992), foi demonstrado que altos valores de  $\log P_{o/a} > 3$  refletem a retenção dos mesmos no estrato córneo.

O fato de só a 4-MC ter permeado através da pele chegando a SR pode ser explicado por ser o ativo que se encontra em maior concentração nas formulações

(4%). WALTERS *et al.*(1997), já haviam descrito e está bem estabelecido que um dos princípios de força direta para a difusão através da pele é a atividade termodinâmica do permeante no veículo doador. Esta atividade é refletida pela concentração do permeante no veículo doador em função de sua solubilidade de saturação com o meio. Quanto mais próximo da concentração de saturação, mais alta é a atividade termodinâmica e maior é a tendência do permeante liberar do veículo. Uma outra explicação, pode ser o fato da 4-MC ser o ativo de menor massa molecular (254,4 g/mol), o que dá um indicativo do seu tamanho molecular e que está relacionado com o coeficiente de difusão. WESTER e MAIBACH (1992) descreveram que o movimento através da pele provavelmente será maior quanto menor seu peso molecular.

Comentando sobre a diferença de comportamento entre os veículos na influência da presença da 4-MC na SR, pode-se dizer que provavelmente no gel alcoólico, o álcool presente se volatilizou durante a difusão no estrato córneo, criando um sistema supersaturado no qual a liberação da 4-MC foi mais eficiente (ALBERTI *et al.*,2001). Isto é plausível, considerando as observações na literatura, sobre o efeito do etanol na absorção de drogas através da pele. Para o fluido alcoólico, esperava-se o mesmo comportamento, mas isso não ocorreu. Isto pode ter sido devido ao fato do gel alcoólico possuir em sua formulação alguns glicóis, que também são conhecidos por favorecerem a permeação cutânea, além de existir uma diferença na composição dos ésteres entre as formulações. O fluido alcoólico tem em sua composição o isononanoato de octila, um éster hidrorrepelente, que pode ter impedido a passagem do ativo para SR. Para a emulsão o/a, o que provavelmente deve ter ocorrido, é que a 4-MC levou mais tempo para atingir a saturação no meio, só sendo detectada na SR em 23 horas.

Apesar de no presente trabalho não ter sido detectada a presença do AcT na SR, RANGARAJAN e ZATZ ,(2003) observaram em seu estudo com  $\alpha$ -tocoferol livre radiomarcado, a sua presença no fluido receptor a partir de várias formulações. Esta diferença talvez possa ser justificada, pelo fato da técnica de radiomarcagem ser muito mais sensível na detecção de ativos.

Observando o perfil de retenção cutânea dos ativos no experimento *in vitro* nos três veículos, observa-se na **Figura 6**, o comportamento no gel alcoólico, onde apenas o AcT é diferente dos demais, tanto no estrato córneo quanto na [epiderme

sem EC+derme]. Na **Figura 9**, que representa o perfil de retenção cutânea dos ativos na emulsão o/a, também apenas o AcT se difere dos demais. E ainda, representando o perfil de retenção cutânea dos ativos no fluido alcoólico (**Figura 11**) pode ser observado novamente, que o AcT se difere dos demais tanto no estrato córneo como na [epiderme sem EC+derme], mas ainda neste último, a 4-MC se difere dos demais na [epiderme sem EC+derme].

A **Figura 16** representa um comparativo do comportamento do AcT nos três veículos, sendo que a porcentagem de retenção cutânea em todos os veículos é bem maior do que os demais ativos, o que talvez possa ser explicado pelo fato de ser o ativo mais lipofílico e ter uma alta afinidade pelo estrato córneo, o que é observado claramente no gel e no fluido alcoólico, nos quais, encontra-se grande quantidade retida no estrato córneo e não é detectado na [epiderme sem EC+derme]. No caso da emulsão o/a, a retenção cutânea do AcT é diferente dos demais veículos, sendo que todo o AcT é encontrado na [epiderme sem EC+derme]. O que pode ter ocorrido, é que no decorrer do experimento o AcT que estava retido no estrato córneo, foi passando integralmente para a [epiderme sem EC+derme] e por ser a emulsão o/a, uma estrutura micelar, estando o AcT no interior das mesmas e a sua fase externa ser água, pode ter proporcionado uma maior facilidade do mesmo passar do estrato córneo (lipofílico) para a epiderme viável e derme (hidrofílicas). O comportamento que o AcT apresentou na emulsão o/a é desejável e seria o ideal, pois a maior parte das reações oxidativas ocasionadas pela radiação UV ocorrem na epiderme viável e na derme e ainda sabe-se, que a maior parte do metabolismo do AcT em tocoferol livre é realizado na epiderme viável e derme.

TRABER *et al.* (1998), estudaram a penetração e distribuição do  $\alpha$ -tocoferol na pele de ratos e observaram que a maior fração, não estava na superfície mais sim, nas camadas mais profundas. Este resultado condiz com o obtido no experimento com a emulsão o/a.

RANGARANJAN e ZATZ, (2003) observaram que quanto maior a concentração de  $\alpha$ -tocoferol na formulação, maior a quantidade encontrada na pele e ainda, verificaram que não há diferença na liberação do  $\alpha$ -tocoferol entre formulações contendo filtros solares e uma formulação controle.

LAMPEN *et al.* (2003), observaram que o AcT em um creme com micropartículas e outro com lipossomas, induziram uma ativação considerável das



células da epiderme e que podem ter contribuído para uma penetração mais eficiente da formulação com lipossomas, liberando uma maior quantidade de AcT no estrato córneo, comparado com as outras formulações. Esta diferença pode ser explicada pela alteração da plasticidade do estrato córneo, induzindo uma grande capacidade reservatória e uma ativação das camadas superficiais da epiderme.

As **Figuras 13, 14 e 15** demonstram um comparativo do comportamento de retenção cutânea dos filtros solares nos diferentes veículos. A **Figura 13** mostra a 4-MC, indicando que há diferença na porcentagem de retenção no estrato córneo do gel alcoólico para os demais, sendo que neste houve uma retenção maior do que na emulsão o/a e no fluido alcoólico. Ainda na mesma figura, percebe-se que na [epiderme sem EC+derme], o comportamento da 4-MC no fluido alcoólico é diferente dos demais, tendo neste uma retenção menor. Estes resultados são condizentes com os obtidos na permeação cutânea já explicada acima, onde somente no gel alcoólico e na emulsão o/a foram detectados a presença da 4-MC no fluido receptor, deste modo, justifica-se estes apresentarem uma maior concentração da mesma na [epiderme sem EC+derme] que o fluido alcoólico.

Na **Figura 14**, pode ser observado o comportamento do BMDM frente aos diferentes veículos. Pode ser observado que há diferença no estrato córneo do experimento com o fluido alcoólico para os demais, tendo este uma retenção menor que os demais veículos. Já na [epiderme sem EC+derme], o gel alcoólico tem um comportamento diferente, tendo uma retenção maior que os demais, sendo que na emulsão o/a o BMDM não é detectado. Novamente aqui, o gel alcoólico demonstra ter um comportamento diferente do fluido alcoólico tanto no estrato córneo como na [epiderme sem EC+derme], sendo que o último apresenta ter sempre uma retenção cutânea menor. CHATELAIN *et al.*(2002) não detectaram o BMDM na derme, utilizando dois veículos diferentes, sendo eles uma emulsão o/a e um gel de petrolato, o que condiz com o resultado obtido, onde somente na emulsão o/a, o BMDM não foi detectado na [epiderme sem EC+derme],

LAZAR *et al.*(1996), observaram em um estudo realizado *in vitro* que a taxa de penetração da 4-MC e do BMDM recuperada na derme depois de 24 horas foi de não mais que 5% da dose aplicada, o que condiz com os resultados obtidos neste trabalho.

A **Figura 15** mostra o comportamento do OC nos três veículos. No estrato córneo, existe uma diferença do gel alcoólico para os demais, tendo este, uma retenção maior. Já na [epiderme sem EC+derme], o fluido alcoólico se difere dos demais, tendo uma retenção menor. Isto confirma, mais uma vez, o que já foi citado no parágrafo anterior, onde o gel alcoólico proporciona sempre uma retenção no estrato córneo maior e no fluido alcoólico, menor.

As **Tabelas 18, 19, 20 e 21** demonstram a retenção na superfície cutânea dos ativos nos diferentes veículos, valores obtidos através do procedimento de lavagem da pele com a SR em 8 horas de experimento.

Na **Tabela 18**, pode-se observar que a quantidade de AcT retido na superfície cutânea foi diferente no fluido alcoólico se comparado com a emulsão o/a e com o gel alcoólico, significando que no experimento realizado com o fluido alcoólico, o AcT estava mais disponível sobre a superfície cutânea do que nos demais veículos.

Nas **Tabelas 19 e 21**, pode ser observado que não há diferença de retenção na superfície cutânea entre a 4-MC e o OC nos diferentes veículos, havendo apenas diferença com BMDM, sendo que a retenção na superfície cutânea com o gel alcoólico foi menor que nos demais, o que pode ser observado na **Tabela 20**. Este resultado é condizente com o obtido na retenção cutânea da [epiderme sem EC+derme] (**Figura 14**), onde a concentração de BMDM no gel alcoólico foi maior que nos demais veículos, sendo então compreensível que a mesma, seja menor na superfície cutânea.

Analisando o experimento realizado *in vitro*, que comparou a influência de três diferentes veículos na permeação e retenção cutânea dos filtros solares 4-MC, BMDM, OC) associados ao AcT, pôde-se perceber que há influência dos veículos no perfil de permeação e retenção cutânea dos ativos e pode-se considerar que o veículo emulsão o/a, é o mais indicado para este tipo de associação, pois neste, houve retenção da maior parte dos filtros solares na superfície cutânea e no estrato córneo durante o experimento, além de ter possibilitado que o AcT ficasse retido em grande quantidade na [epiderme sem EC+derme], onde ocorre a maior parte das reações oxidativas ocasionadas pela radiação UV.

Previamente ao estudo *in vivo*, foram realizadas as medidas de perda transepidermal de água e observando a **Tabela 22**, pode-se perceber que todos os voluntários apresentaram perda transepidermal de água, condizentes com valores

considerados normais, podendo-se julgar que todos apresentavam integridade cutânea confirmados por visualização e ausência de processos alérgicos.

Segundo SCHAEFER e REDELMEIER, (1996), uma estimativa razoável para perda de água transepidermal da pele para a parte interna do braço é de 6 a 8 g/m<sup>2</sup>h.

No estudo *in vivo* de permeação cutânea observou-se que, em relação ao AcT, houve uma diferença na retenção do mesmo no estrato córneo em 30 minutos, do gel alcoólico em relação aos demais veículos, sendo que neste, a porcentagem recuperada de AcT no estrato córneo foi maior. (**Figura 17**). Já, em quatro horas, há uma diferença na porcentagem de retenção cutânea na emulsão o/a, sendo esta, menor que os outros veículos, podendo com isso sugerir, que ao passar do tempo, utilizando a emulsão o/a como veículo, a quantidade de AcT retida no estrato córneo vai diminuindo e o mesmo vai passando para a epiderme viável, derme e possivelmente para a circulação sanguínea. Isto provavelmente ocorra, como já descrito acima no experimento *in vitro*, devido ao fato da emulsão ser uma estrutura micelar estando o AcT no interior das mesmas e a sua fase externa ser água, proporcionando uma maior facilidade do mesmo passar do estrato córneo (lipofílico) para a epiderme viável e derme (hidrofílica). Ainda, observando os resultados obtidos, quanto à retenção do AcT na superfície cutânea (**Tabela 24**), observa-se que em 30 minutos, a porcentagem retida utilizando o gel alcoólico como veículo, foi diferente dos demais, sendo menor. Este resultado é condizente, visto que, como citado acima, a retenção do AcT no estrato córneo com o gel alcoólico foi maior podendo com isso perceber, que o gel retém mais o AcT no estrato córneo, deixando-o menos disponível na superfície cutânea.

Observando o comportamento de retenção cutânea no estrato córneo da 4-MC e do OC (**Figuras 18 e 20**), verifica-se que o gel alcoólico em 30 minutos, tem um comportamento diferente dos demais veículos, sendo que a porcentagem retida é maior. Ainda, em quatro horas, o comportamento do gel alcoólico novamente se difere dos demais veículos, mas desta vez, retendo uma porcentagem menor de 4-MC e OC que os demais. As **Tabelas 26 e 30** trazem os valores de retenção na superfície cutânea da 4-MC e OC, onde em 30 minutos o gel alcoólico se difere dos demais veículos sendo a porcentagem encontrada menor, condizente com o resultado obtido na retenção da 4-MC e OC no estrato córneo descrito acima, onde

no gel alcoólico é maior. Em 4 horas, a retenção na superfície cutânea do gel alcoólico ainda se difere dos demais, sendo menor. Analisando este comportamento, pode-se sugerir que inicialmente, em 30 minutos, o gel alcoólico possibilita uma retenção maior no estrato córneo da 4-MC e do OC, mas com o passar do tempo, os mesmos passam do estrato córneo para as outras camadas da pele, justificando-se então, a baixa porcentagem recuperada no estrato córneo em 4 horas. Uma explicação para isto, pode ser como já descrito anteriormente, o fato do gel alcoólico criar um sistema supersaturado para a 4-MC e OC, possibilitando uma maior tendência do permeante se liberar do veículo.

JACOBI *et al.*, (2004), observaram que a penetração da 4-MC no estrato córneo foi influenciada por diferentes veículos, promotores de penetração e parâmetros de duração da aplicação.

A **Figura 18** ilustra o comportamento de retenção cutânea no estrato córneo do BMDM. Pode ser observado que em 30 minutos, não há diferença de comportamento entre os veículos, mas já em quatro horas, o gel alcoólico se difere dos demais veículos, tendo uma porcentagem de retenção do BMDM no estrato córneo menor, demonstrando o que foi justificado acima, onde o gel alcoólico deve criar um sistema supersaturado, liberando o ativo mais facilmente e possibilitando sua passagem.

LAZAR *et al.*, (1998), observaram que a capacidade reservatória do estrato córneo para o BMDM e para a 4-MC é de aproximadamente 30% da dose aplicada sendo que esta concentração é alcançada rapidamente, em torno de 10 minutos, e deve corresponder ao nível de saturação, pois depois de 100 minutos a mesma taxa foi recuperada. No presente trabalho, isto foi observado, verificando o comportamento da emulsão o/a e do fluido alcoólico, onde a porcentagem recuperada em 30 minutos e 4 horas foram semelhantes; o que não foi observado no gel alcoólico como já descrito.

No experimento realizado *in vivo*, pode ser observado que há influência do veículo na retenção cutânea dos ativos no estrato córneo, já LAZAR *et al.*, (1998), observaram que a quantidade de filtros recuperada nos adesivos removidos por *tape stripping* foi independente dos veículos mais citam que outros pesquisadores mostraram que os filtros solares incorporados em produtos de proteção solar são

absorvidos depois de aplicação tópica em uma baixa taxa e a penetração foi dependente do veículo.

Ainda, LAZAR *et al.*, (1998) citam a hipótese de que a quantidade total destes filtros solares altamente lipofílicos, retidos no estrato córneo, 30 minutos depois da aplicação, corresponda à dose a qual terminará passando para a circulação sanguínea, mas isto não foi verificado e também porque a quantidade dos filtros retidos no estrato córneo podem seguir vários caminhos, sendo que isto está relacionado com a estrutura química e o balanço hidrofílico-lipofílico de cada componente, bem como, o veículo em que é incorporado.

Analisando os resultados obtidos nos experimento *in vitro* e *in vivo*, pode ser observado que a porcentagem encontrada de todos os ativos no estrato córneo, *in vivo*, foram maiores do que as encontradas *in vitro*, ao passo que a recuperação dos ativos na superfície cutânea foi maior *in vitro* que *in vivo*. Esta diferença pode ter ocorrido, devido aos diferentes procedimentos de retirada dos ativos da superfície cutânea, onde *in vivo*, foi feita com as duas primeiras remoções dos adesivos e *in vitro*, a pele foi lavada com a SR, o que pode ser considerada uma remoção mais efetiva.

Observando o comportamento de retenção cutânea do AcT nos diferentes veículos, pôde-se observar que ao longo do tempo, em ambos os experimentos a emulsão o/a se diferenciou dos demais veículos, possibilitando a retenção do AcT em grande concentração na epiderme viável e na derme. No experimento *in vitro*, não foi observado AcT na SR, ficando o mesmo acumulado na epiderme viável e derme. SCHAEFER e REDELMEIER, (1996), sugeriram em uma comparação *in vitro/in vivo* que, compostos hidrofóbicos são mais problemáticos, e isto, é devido ao f acúmulo destes compostos na derme, a qual é exacerbada para compostos menos solúveis na SR, podendo, portanto, a absorção percutânea *in vitro* ser subestimada.

Analisando o comportamento dos filtros solares frente ao diferentes veículos, novamente pode-se verificar uma similaridade entre os resultados OBTIDOS *in vitro* e *in vivo*, verificando que o gel alcoólico tem uma tendência em proporcionar uma maior retenção dos mesmos no estrato córneo, epiderme viável e derme em relação aos demais veículos. No experimento *in vivo*, foi verificado um comportamento diferenciado dos veículos em relação ao experimento *in vitro*, principalmente do gel alcoólico, onde após quatro horas, a recuperação dos filtros no estrato córneo e na

superfície cutânea foi em torno de 40% da dose aplicada, podendo indicar que o restante poderia estar na epiderme viável, derme e circulação sanguínea. Mas segundo SCHAEFER e REDELMEIER, (1996), vale lembrar que a técnica de *tape stripping* não resulta na total remoção do estrato córneo, então o material recuperado deve ser tratado como uma significativa fração do estrato córneo mas não 100%.

A proposta de um experimento *in vitro* é prever a absorção percutânea *in vivo*, mas um cuidado deve ser tomado na extrapolação de informações para as situações *in vivo*, especificamente para condições de aplicações diferenciadas, formulações, espécies entre outros. Ainda, a análise é restrita a comparações da dose absorvida cumulativa, pois em geral, estudos *in vivo*, não promovem informações cinéticas. (SCHAEFER e REDELMEIER, 1996).



## 7. CONCLUSÕES

- Os valores de coeficiente de partição o/a encontrado para os filtros solares e para o acetato de tocoferol indicaram que todos apresentaram características lipofílicas.
- Os valores de coeficiente de partição estrato córneo/veículo para os filtros solares e para o acetato de tocoferol indicaram que todos os veículos em estudo tiveram a capacidade de liberar os ativos da formulação para o estrato córneo.
- Tanto nos experimentos *in vitro* como *in vivo* foi observado que há influência dos veículos na permeação e retenção cutânea da 4-metilbenzilideno cânfora, butil metoxidibenzoilmetano, octocrileno e acetato de tocoferol.
- Pelos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* a emulsão o/a demonstrou ser o veículo de escolha para este tipo de associação, pois manteve os filtros solares sob a superfície cutânea e estrato córneo e ao mesmo tempo, possibilitou que o acetato de tocoferol estivesse presente, em grande quantidade na epiderme viável e derme.
- No experimento *in vivo*, com o passar do tempo, a quantidade de ativos detectada na superfície cutânea e no estrato córneo foi menor do que a encontrada *in vitro*, principalmente com o gel alcoólico, o que pode ser um indicativo de que a permeação cutânea pode ser sub-estimada *in vitro*, devendo sempre ser confirmada *in vivo*.
- Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que o experimento *in vitro* foi adequado para dar um direcionamento e uma estimativa, que posteriormente foram confirmados pelo experimento *in vivo*.





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI,I.;KALIA,N.I.;NAIK,A.;BONNY,J.D.;GUY,H.R. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum, in vivo. **Intern. J. Pharm**, v.219, p.11-19, 2001.

ALBERTS,D.S.;GOLDMAN,R.;XU,M.J.;DORR,T.;QUINN,J.;WELCH,K.; GUILLEN RODRIGUEZ,J.;AICKIN,M.;PENG,Y.M.;LOESCHER,L.; GENSLER,H. Disposition and metabolismo of topically administered  $\alpha$ -tocopherol acetate: A common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics. **Nutr. Cancer**, v.26, p.193-201, 1996.

ARNES,B.N.Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.221, p.1256-1264, 1983.

AUTIER,P. Melanoma and the use of sunscreens: Na EORTC case –control study in Germany, Belgium and France. **Int. J. Cancer**, v 61, p 749-755, 1995.

AUTIER,P.;PEDEUX,R.; DORÉ,J.F. Sunscreen use and duration of sun exposure :A double blind randomized trial. **J. Natl. Cancer Inst**, v.91, p.1304-1309, 1999.

AZIZI,E. Use of sunscreen is linked whith elevated naevi counts in Israeli school children and adolescents. **Melanoma Res**, v10, p.491-498, 2000.

BAREL,A.O.;PAYE,M.;MAIBACH,H.I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Marcel Dekker, New York, 2001.

BARRY,B.W. **Dermatological Formulations, Percutaneous Absorption**. Marcel Dekker, New York, p.95-213, 1987.

BASHIR,S.J.;CHEW,A.L.;ANGIGBOGU,A.; DREHER, F.; MAIBACH, H.I. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. **Skin Res. Technol.**, v.4, p.40-48, 2001.

BERARDESCA,D.F.;RIGAL,J.;LEVEQUE,J.M.; MAIBACH, H.I. In vivo biophysical characteristic of skin physiological differences in races. **Dermatologica**, v.182, p.89-93, 1991.

BERSET, G.; GONZENBACH, H.; CHRIST, R.; MARTIN, R.; DEFLANDRE, A.; MASCOTTO, R.E.; JOLLEY, J.D.R.; LOWELL, W.; PELZER, R.; STIEHM, T. Proposed protocol for determination of photostability. Part I: cosmetic UV filters. **Int. J. Cosmet.**, v.18, p.167-177, 1996.

BILLHIMER, W.L. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra a queimadura solar. **Cosmet.Toiletries**, v.1,n.3,p.41-48,1989.

BONDA,C.Formulating stable, high SPF, broad spectrum sunscreens with Avobenzone. **SCC Annual Scientific Meeting**, 1997.

BRINON,L.;GEIGER,S.;ALARD,V.;DOUCET,J.;TRANCHANT,J.F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Release**, v.60, p.67-76, 1999.

BURREN,R;SCALETТА,C;FRENK,E;PANIZZON,R.G; APPIEGATE, L.A. Sunlight and carcinogenesis: Expression of p53 and pyrimidine dimers in human skin following UVA I + II and solar simulating radiations. **Int. J. Cancer**, v. 76, p. 201-206, 1998.

CHATELAIN,E.;GABARD,B; SURBER,C. Skin Penetration and Sun Protection Factor of Five UV Filters: Effect of the Vehicle. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.16, n.1, p.28-35, 2003.

COLE,C.;VAN FOSSEM,R. Measurements of sunscreen UVA protection: a human model not sensitive. **Am. J. Acad. Dermatol**, v.26, p.178-183, 1992.

CROSS,S.E.; JIANG,R.;BENSON,H.A.E.;ROBERTS,M.S. Can Increasing the Viscosity of Formulations be used to Reduce the Human Skin Penetration of the Sunscreen Oxybenzone. **J. of Invest. Dermat.**, v.117, n.1, p. 147-150, 2001.

DARR,D; DUNSTON,S; FAUS,H; PINNELL,S. Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. **Acta Derm Venereol.**, v.76, p.264-268, 1996.

DUMAY,O; KARAM,A; VIAN,L. Ultraviolet exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: Partial protection by a broad spectrum sunscreen. **Br. J. Dermatol**, v.144, p. 1161-1168, 2001.

DUPUIS,D.; ROUGIER,A.; ROGUET,R.; LOTTE,C. The measurement of the SC reservoir: A simple method to predict the influence of vehicles on In-vivo percutaneous absorption. **Br. J .Dermatol.**, v.115, p.133-138, 1986.

EPSTEIN,J.H. **Biological effect of sunlight**. In LOWE, NJ& SHAAT, NA- Sunscreens: development , evaluation and regulatory aspect. Marcel Dekker, New York, 1990

FERNANDEZ,C.; NIELLOUD,F.; FORTUNÉ,R.; VIAN,L.; MARTI-MESTRES, G. Benzophenone-3: rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of in vivo human penetration. **J. Pharm. Biom. Analysis**, v. 28, p. 57-63, 2002.

FLORENCE,A.T.;ATWOOD,D. Solubility and partitioning of drugs. **In:\_Physicochemical principles of pharmacy**. 2.ed. London:MacMillan Press,1988. Cap.5, p.132-171.

FORBES,P.D; DAVIES, R.E; SAMBUCCO, C.P; URBACH, F. Inhibition of ultraviolet radiation-induced skin tumours in hairless mice by topical application of the sunscreen 2-ethyl hexyl p-methoxycinnamate. **J. Toxicol.**, v.8, p. 209-226,1989.

FUCHS,J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha tocopherol, L-ascorbic acid and  $\beta$ -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.848-873, 1998.

FURUSE,K. Vitamine E: Biological and Chemical Aspects of Topical Treatment. **Cosmet. Toil.**, v.102, n.11, p.99-116, 1987.

GASPAR,L.R.; CAMPOS, P.M. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopherol acetate in a sunscreen, preventing erythema and transepidermal waterloss. **Posters of the 22<sup>nd</sup> IFSCC Congress**, p.23-26, 2002.

GASPAR,L.R.; CAMPOS, P.M. Evaluation of the protective effect of alpha-tocopheryl acetate in a sunscreen, preventing erythema formation, transepidermal water loss and sunburn cell formation. **FSCC**, v.6, n.3, 2003.

GENSLER,H.L; AICKIN,M; PENG,Y.M; XU,M. Importance of the form of topical vitamin E for prevention of photocarcinogenesis. **Nutr Câncer**, v. 26, p.183-191,1996.

GEHRING,W.; FLUHR,J; GLOOR,M. Influence of vitamin E acetate on stratum corneum hydration. **Arzneim-Forsch./Drug Res.**,v.48, p.772-775, 1998.

GETTING,S.D.; AZRI-MEEHAN,S.; DEMETRULIAS,J.L.; DRESSLER,W.E.; KASTING,G.B.; KELLING,C.K.; HOWES,D. The use of *in vitro* skin penetration data in the safety assessment of cosmetic formulations. **In Prediction of Percutaneous Penetration**, v. 3b, p.621-637, 1993.

GUPTA,V.K.; ZATZ, J.L.; REREK,M. Percutaneous Absorption of Sunscreens Through Micro-Yucatan Pig Skin *In Vitro*. **Pharmaceutical Research**, v.16, p.1602-1607, 1999.

HANSON,K.M.; CLEGG,R.M. Bioconvertible vitamin antioxidants improve sunscreen photoprotection against UV-induced reactive oxygen species. **J. Cosmet. Sci**, v.54, p.589-598, 2003.

HAYDEN,C.G.J. Systemic absorption of sunscreens after topical application. **The Lancet**, v.350, p.863-864, 1997.

HAYDEN,C.G.J; BENSON,H.A.E; ROBERTS,M.S. **Sunscreens Toxicological aspects**; In: Roberts M.S,W.K. Dermal Absorption and Toxicity Assessment. **Dekker**, New York, p.537-599, 1994.

HAYWOOD,R.; WARDMAN,P.; SANDERS,R.; LINGE,C. Sunscreens Inadequately Protect Against Ultraviolet-A-Induced Free Radicals in Skin: Implications for Skin Aging and Melanoma. **J. Invest. Dermatol.**, v.121, n.4, 2003.

HENEGOUWEN,G.M.J;VRIES,H;BROEKE,L.T;JUNGINGER,H.E. R,R,R-tocopherols and their acetates as a possible scavenger of free radicals produced in the skin upon UV-A exposure-An *in vivo* screening method. **Fat. Sci. Technol.**, v. 94, p.24-27,1992.

HERBERT, A.A. Photoprotection in children. **Adv. Dermatol.**, v.8, 309-324, 1983

HORIOT,T.; MIYAUCHI,H.; SINDHVANANDA,J.; SOH,H.; KUROKAVA,I.; ASADA, Y. The effect of ultra-violet (UVB and UVA) radiation on the expression of epidermal keratins. **Br. J. Dermatol.**, v. 28, p. 10-15, 1995.

IDSON,B. Vitamins in emolliency and moisturizing preparations. **Cosmet. Toil.**, v.93, p.77-79, 1978.

JACOBI,U.;WEIGAMANN,H.J.;BAUMANN,M.;REICHE,A.I.;STERRY,W.;LADEMAN  
NN,J. Lateral spreading of topically applied UV filters substances investigated by  
tape stripping. **Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol.**,v.17,p.17-22,2004.

JACOBI,U.;KAISER,M.;RICHTER,H.;AUDRING,H.;STERRY,W.;LADEMAN,N.J.  
The number of stratum corneum cell layers correlates with the pseudo-absorption  
of the corneocytes. **Skin Pharmacol.Appl.Skin Physiol.**,v.18,p.175-179,2005.

JIANG,R.; BENZON,H.A.E.; CROSS,S.E.; ROBERTS,M.S. In vitro human  
epidermal and polyethylene membrane penetration and retention of the  
sunscreen benzophenone-3 from a range of solvents. **Pharm. Res.**, v.15, p.1863-  
1868, 1998.

JIANG,R.; ROBERTS,M.S.; COLLINS,D.M.; BENSON,H.A.E. Absorption of  
sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children  
and adults. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.48, p.635-637, 1999.

KLIGMAN,L.H.; AKIN,F.J; KLIGMAN,A.M. Sunscreens prevent ultraviolet  
photocarcinogenesis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.3, p.30-35, 1980.

KLIGMAN,L.H.; AKIN,F.J.; KLIGMAN,A.M. Prevention of ultraviolet damage to the  
dermis of hairless mice by sunscreens. **J. Invest. Dermatol.** v.78, p.181-189,  
1982.

KOH,H.K.;LEW,R.A. Sunscreens and melanoma: implications for prevention. **J.  
Natl. Cancer Inst.** V.86,p.78-79,1994.

LAMPEN,P.;PITTERMANN,W.;HEISE,H.M.;SCHMITT,M.;JUNGSMANN,H.;KIETZ MANN,M. Penetration studies of vitamin E acetate applied from cosmetic formulations to the stratum corneum of an in vitro model using quantification by tape stripping, UV spectroscopy, and HPLC. **J Cosmet Sci**, v.54, n.2, p.119-131, 2003.

LAZAR,G.M.; BAILEET, FRUCTUS,A.E.; BATTANDIER,J.A.; FERRIER,D.; MARTY, J.P. Evaluation of In vitro percutaneous absorption of UV filters used in sunscreen formulations. **Drug Cosmet. Ind.**, v. 158, p.50-62, 1996.

LAZAR,G.M.; BAILLET,A.; FRUCTUS,A.E.; TOGKOZ,S.; VINCENT,C.M.; MARTY, J.P. Evaluation of percutaneous penetration and photochemical behaviour of sunscreens by stripping. **20<sup>th</sup> IFSCC Congress**, v.1, n.8, p.105-113, 1998.

LIN,J.Y.; SELIM,A.; SHEA,C.R.; GRICHNIK,J.M.; OMAR,M.M.; MONTEIRO-RIVIERE,N.A.; PINNELL,S.R. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.48, n.6, p.866-874, 2003.

LINGE,C. Relevance of *in vitro* melanocytic cell studies to the understanding of melanoma. **Cancer Surveys**, v.26, p.71-87,1996.

LOPES, P.S; KANEKO,T.M. Membranas no estudo de permeação cutânea. **Cosmet. Toil.**, v.12, p.62-67, 2000.

LOTTE,C.; WESTER,R.C.; ROUGIER,A.; MAIBACH,H.I. Racial differences in the in vivo percutaneous absorption of some organic compounds: a comparison between black, Caucasian and Asian subjects. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 284, p. 456-459, 1993.



MATSUI,M.S; DELEO,V.A. Longwave ultraviolet radiation and promotion of skin cancer. **Cancer Cells.**, v.3, p.8-12, 1991.

MOAN,J ; DAHLBACK,A; SETLOW,R.B. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. **Photochem. Photobiol.**, v.7, p.243-247, 1999.

MORISON, W.L. The effect of a sunscreen containing paraaminobenzoic acid on the sistemic immunologic alterations induced in mice by exposure to UVB radiation. **J. Invest. Dermatol.**, v.83, p.405-408, 1984.

NANGIA,A.; PATIL,S.; BERNER,B.; BOMAN,A; MAIBACH, H. In vitro measurement of transepidermal water loss: a rapid alternative to tritiated water permeation for assessing skin barrier functions. **Intern. J. Pharmac.**, v.170, p.33-40, 1998.

NAYLOR,M.F; BOYD,A; SMITH,D.W; CAMERON,G.S; HUBBARD,D; NELDNER, K.H. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. **Arch. Dermatol.** , v.131, p.170-175, 1995.

NESS, A.R.; FRANKEL,S.J.; GUNNEL,D.J. Are we really dying for a tan. **British Medical Journal**, v.319, p.116, 1999.

NOHYNEK,G.J. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Söfw-Journal**, v.127, p.20-23, 2001.

NORKUS, E.P; BRYCE,G.F; BHAGAVAN, H.N. Uptake and bioconversion of alpha-tocopheryl acetate to alpha-tocopherol in skin of hairless mice. **Photochem. Photobiol.**, v.57, n.4, p.613-615, 1993.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method (Março, 1989).

OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 428: Skin Absorption: *in vitro* Method (Dezembro, 2000)

PACKER,L. Ultraviolet radiation (UVA .UVB) and skin antioxidants In: Rice-Evans CA. Burdon RH. (eds.).**Free Radical Damage and its Control**. Elsevier Science, Amsterdam, 1994.

PATEL,N.P.; HINGHTON,A.; MOY,R.L. Properties of topical sunscreen formulation: a review. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, v.18, p.316-320, 1992.

PATHAK,M.A. Photobiology of melanin pigmentations. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 9, p.724-733, 1983.

PHILLIPSON,R.P; TOBI, S.E; MORRIS,J.A; MCMILLAN, T.J. UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 32, p. 474-480, 2002.

RANGARAJAN,M.; ZATS,J. Effect of formulation on the delivery and metabolism of alpha-tocopheryl acetate. **J. Cosmet. Sci.**,v.52,p.225-236, 2001.

RANGARAJAN,M.; ZATS,J. Effect of formulation on the topical delivery of  $\alpha$ -tocopherol. **J. Cosmet. Sci.**, v.54, p.161-174, 2003.

REEVE,V.E; BOSNIC, M; BOEHM-WILCOX,C. Effect of ultraviolet (UV) radiation and UVB-absorbing sunscreen ingredients on 7.12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated skin tumorigenesis in hairless mice. **Photodermal Photoimmunol Photomed**, v. 7, p. 222-227, 1990.

RIEGER, M.M. Efeito protetor dos filtros contra patologias da pele. **Cosm. Toil.**, v.3, p.33-48, 1989.

ROBERTS, M.S. Structure-permeability considerations in percutaneous absorption. In **Prediction of Percutaneous Penetration**. v.2, IBC Technical Services, London, 1991, p.210-228.

ROUGIER, A.; LOTTE, C.; DUPUIS, D. An original predictive method for in vivo percutaneous absorption studies. **Int. J. Cosm. Sci.**, v. 38, p. 397-417, 1987.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H.A.E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal Chromat. B**, v. 803, p.225-231, 2004.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **J. Pharm. Sci.**, v. 80, p. 104-107, 1991.

SAYRE, R.M.; KOLLIAS, N.; ROBERTS, R.L.; BAQER, A.; SADIQ, I. Physical sunscreens. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.41, p.103-109, 1992.

SCHAEFER, H.; REDELMEIER, T.E. **Skin Barrier: principles of percutaneous absorption**. Karger, Basel, p.134-161, 1996.

SCHARFETTFER-KOCHANKE, K.; WLASCHEK, M.; BRENNEISEN, P.; SCHAUEN, M.M.; BLAUDSCHUN, R.; WENK, J. UV-Induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoageing. **Biol. Chem.**, v. 378, p.1247-1257, 1997.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H.; BRAUNER, G.J.; MCFARLANE, D.J. Percutaneous absorption of steroids. **J. Invest. Dermatol.**, v.52, n.1, p.63-70, 1969.

SCHUELLER,R.; ROMANOWSKI,P. Introdução aos Produtos Fotoprotetores. **Cosmet. Toil.**, v.12, p.60-67, 2000.

SEKURA SYNDER, D.; MAY,M. Ability of PABA to potect mammalian skin from ultra-violet light-induced skin tumours and actinic damage. **J. Invest. Dermatol.**, v.65, p.543-546,1975.

SHAAT, N.A. **Evolution of modern sunscreen chemicals**. In LOWE, NJ&SHAAT, NA- Sunscreens: development , evaluation and regulatory aspects. Marcel Dekker, New York, 1990.

SRC's LogKow (KowWin) Program. Disponível em <http://www.syrres.com/esc/kowwin.htm>. Acesso em: 28 out. 2004.

STOKES,R. DIFFEY,B. How well are sunscreen users protected? **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.13, p.186-188, 1997.

TAYLOR,C.R.; STERN,R.S; LEYDEN,J.J; GILCHREST,B.A. Photoaging, photodamage and photoprotection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.22, p.1-15, 1990.

THE UNITED States Pharmacopeia. 29.ed. Rockville:United Stated Pharmacopeial Convention. 2002.

THIELLE,J..J. Oxidative targets in the stratum corneum: a new basis for antioxidative strategies. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.14, p.87-91, 2001.

THOMPSON,S.C.; JOLLEY,D.; MARKS,R. Reduction of solar keratoses by regular sunscreen use. **N. Engl. J. Med.** , v. 329, p. 1147-1151, 1993.

TOJO,K.; TSAI,R.;TESTA,B.;CARRUPT,P.Percutaneous penetration of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.76, n.2, p123-126, 1987.

TRABER, M.G.; RALLIS, M.; PODDA, M.; WEBER, C.; MAIBACH, H.I.; PACKER, L. Penetration and Distribution of  $\alpha$ - Tocopherol,  $\alpha$ - or  $\gamma$ -Tocotrienols Applied Individually onto Murine Skin. **Lipids**, v. 33, n.1, p. 87-91, 1998.

TREFFEL,P.; GABARD,B. Skin penetration and sun protection factors of ultra-violet filters from two vehicles. **Pharm. Res.**, v.13, p. 770-774, 1996.

TREVITHICK,J.R.; MITTON,K.P. Topical application and uptake of vitamin E acetate by the skin and conversion to free vitamin E. **Biochem. Molecular Biology Intern.**, v.31, n.5, p.869-878, 1993.

VAINIO,H; BIANCHINI,F. Cancer-preventative effects of sunscreens are uncertain. **Scand. J Work Environ Health**, v.26, p.529-531,2000.

VANQUERP,V.; RODRIGUEZ,C.; COIFFARD,C.; COIFFARD,L.J.M. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. **J. Chromatogr. A.**, v. 832, p. 273-277, 1999.

VERTUANI,S.; ZIOSI,P.; SOLAROLI,N.; BUZZONI,V.; CARLI, M.; LUCCHI,E.; VALGIMIGLI,L.; BARATTO,G.; MANFREDINI,S. Determination of antioxidant efficacy of cosmetic formulations by non-invasive measurements. **Skin Research Technol.**, v. 9, p.245-253, 2003.

WALTERS,K.A.; BRAIN,K.R.; HOWES,D.; JAMES,V.J.; KRAUS,A.L.; TEETSEL,N.M.; TOULON,M.; WATKINSON,A.C.; GETTINGS,S.D. Percutaneous Penetration of Octyl Salicylate from Representative Sunscreen Formulations through Human Skin *In Vitro* . **Food Chemical Toxicology**, v.35, p.1219-1225, 1997.

WANG, M.Y.; YANG, Y.Y.; HENG, P.W.S. Role of solvent interactions between fatty acids-based formulations and lipids in porcine stratum corneum. **J. Control. Release**, v.94, p.207-216, 2004.

WATKINSON,A.C.; BRAIN,K.R.; WALTERS,K.A.; HADGRAFT,J. Prediction of the percutaneous penetration of ultra-violet filters used in sunscreen formulations. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 14, p. 265-275, 1992.

WEIGAMANN,H.J.;ULRICH,J.;SCHANZER,S.;JACOBI,U.;SCHAEFER,H.;STERR Y,W.;LADEMANN,J. Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**,v.18,n.4,p.180-185,2005

WELLS,J.I.; **Pharmaceutical Preformulation** in: The physicochemical properties of drug substances. Ellis Horwood, 1988, p.21-85.

WESTER,R.C.; MAIBACH,H.I. Percutaneous absorption of drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v.23, p.253-266, 1992..

WILSCHUT,A.; TEN BERGE,W.F.; ROBINSON,P.J.; MCKONE,T.E. Estimating Skin Permeation. The Validation of five Mathematical Skin Permeation Models. **Chemosphere**, v.30, n.7, p.1275-1296, 1995.

WOLF,P; YAROSH,D.B; KRIPKE,M.L. Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice. **J. Invest. Dermatol.**, v.101(4), p.523-527, 1993.

WULF,H.C; STENDER,I.M; LOCK-ANDERSEN,J. Sunscreens used at the beach do not protect against erythema: A new definition of SPF is proposed. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.13, p.129-132, 1997.

YANO,T; NAKAGAWA,M; TSUJI,M; NODA,K. Skin permeability of various non-steroidal anti-inflammatory drugs in man. **Life Sciences**, v.39, p.1043-1050, 1986.